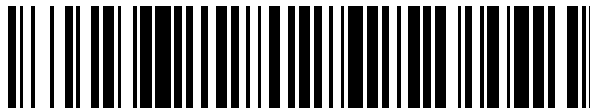


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 717 274**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0797 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)
C12N 15/867 (2006.01)
C07K 14/12 (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 5/0735 (2006.01)
C07K 7/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.01.2013 PCT/EP2013/050426**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **18.07.2013 WO13104728**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.01.2013 E 13700169 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2018 EP 2802662**

54 Título: **Uso de partículas lentivíricas pseudotipadas para la transducción dirigida in vitro de embriocitoblastos humanos pluripotentes indiferenciados y citoblastos pluripotentes inducidos**

30 Prioridad:

11.01.2012 EP 12000142

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.06.2019

73 Titular/es:

**PAUL-EHRLICH-INSTITUT BUNDESAMT FÜR
SERA UND IMPFSTOFFE (100.0%)
Paul-Ehrlich-Strasse 51-59
63225 Langen, DE**

72 Inventor/es:

**SCHNEIDER, IRENE;
BUCHHOLZ, CHRISTIAN;
SCHUMANN, GERALD y
JUNG-KLAWITTER, SABINE**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 717 274 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

Uso de partículas lentivíricas pseudotipadas para la transducción dirigida *in vitro* de embriocitoblastos humanos pluripotentes indiferenciados y citoblastos pluripotentes inducidos

Campo técnico

- 5 La presente divulgación se refiere a novedosas partículas lentivíricas pseudotipadas y su uso en la transducción dirigida *in vitro* de embriocitoblastos humanos pluripotentes indiferenciados (hESC) y los citoblastos pluripotentes inducidos (iPSC).

Estado de la técnica

- 10 Los citoblastos son células indiferenciadas que se encuentran en todos los organismos multicelulares que se pueden dividir mediante mitosis y diferenciarse en diversos tipos de células especializadas y pueden autorrenovarse para producir más citoblastos. Son capaces de diferenciarse en una variedad de tipos de células y, por consiguiente, pueden ser una fuente de sustitución de células y tejidos que se dañan en el curso de la enfermedad, infección o debido a anomalías congénitas (Lovell-Badge, R., Nature, 2001, 414: 88-91). Existen diversos tipos de citoblastos que se caracterizan por su diferenciación potencial *in vivo* e *in vitro*, dependiendo concretamente del tejido del que se aíslan. transportan las únicas funciones de tejidos concretos cuando se diferencian en células maduras, en el que se piensa que los citoblastos pluripotentes tienen el potencial para diferenciarse en casi cualquier tipo de célula, mientras que se cree que los citoblastos multipotentes tienen el potencial de diferenciarse solo en muchos tipos de células.

- 20 Los citoblastos pluripotentes (PSC) están disponibles, por ejemplo, como embriocitoblastos indiferenciados (ESC) y pueden cultivarse *in vitro* como líneas permanentes sin experimentar diferenciación. Son capaces de generar todos los tipos de células del cuerpo, pero no del cordón umbilical, los trofoblastos y las estructuras asociadas. Aunque son incapaces de generar un organismo funcional, proporcionan la oportunidad de desarrollar terapias basadas en citoblastos para enfermedades humanas y la reparación de tejidos (Leeb, C. y col., Cell Prolif., 2011, 44, Supl. 1: 9-14). La primera derivación satisfactoria de los ESC humanos (hESC) se ha notificado en 1998 (Thomson, J. A. y col., Science, 1998, 282: 1145-1147), donde los hESC se derivan de la masa de células internas de un blastocito antes de que se implante en la pared del útero. Gearhart y colaboradores derivaron líneas de células germinales embrionarias humanas (hEGC) de tejido de gónadas fetales (Documento US 6.090.622). hESC y hEGC tienen características largamente buscadas de citoblastos pluripotentes: se pueden cultivar extensamente sin diferenciación, tienen un cariotipo normal, y son capaces de producir numerosos tipos de células importantes. Un estímulo significativo al uso de citoblastos pluripotentes para la terapia es que se cultivan tradicionalmente sobre una capa de células alimentadoras para evitar la diferenciación (documento US 5.843.780; documento US 6.090.622). De acuerdo con Thomson y col., (citado anteriormente), los cultivos de hESC sin alimentadores mueren pronto, o se diferencian en una población heterogénea de células comprometidas.

- 35 Debido a que los métodos anteriormente mencionados requieren la destrucción de embriones tempranos, se han aprovechado fuentes alternativas de hESC por motivos éticos. Un tipo de citoblasto pluripotente alternativo de significancia se ha introducido en 2006 donde las células somáticas cultivadas *in vitro* se han revertido a un estado pluripotente similar al embrionario que conduce a la formación de citoblastos pluripotentes inducidos (iPSC; Takahashi, K. y S. Yamanaka, Cell, 2006, 126: 663-676). La reprogramación se llevó a cabo mediante la introducción de determinados genes asociados a citoblastos, es decir, de 3-5 factores (factor 4 de tipo Krüppel, Klf-4; secuencia Y de la región determinante del sexo, Sox, por ejemplo, Sox-2; factor 4 de transcripción de la unión a octámero, Oct4; factor de transcripción Nanog; factor de transcripción cMyc) en células no pluripotentes, es decir, células diferenciadas (por ejemplo, fibroblastos) tanto mediante transducción vírica como mediante transfección. Esta tecnología de reprogramación evita todos los problemas éticos con hESC e incluso, de forma más importante, permite la generación de células pluripotentes para terapias celulares autólogas como iPSC que pueden derivarse directamente del paciente para estrategias médicas personalizadas. Además, esto permite la aplicación de iPSC humanos a características específicas en la investigación de fármacos y en estudios farmacológicos o toxicológicos de seguridad (Leeb, C. y col., Cell Prolif., 2011,44, Supl. 1: 9-14).

- 50 Hasta la fecha, muchos estudios prometedores han mostrado el potencial terapéutico y científico de los citoblastos, en particular de hESC e iPSC. El progreso en la aplicación de hESC e iPSC se consiguió mejorando las técnicas para la transferencia de genes. Se pueden usar citoblastos transfectados de forma estable, por ejemplo, como vehículo celular para la terapia génica de suplemento de proteínas y/o para dirigir los citoblastos en linajes concretos. Además, la inserción de construcciones indicadoras específicas de linaje permitiría el aislamiento de células específicas de linaje y permitiría el descubrimiento de fármacos, la validación de la diana, y/o los estudios basados en citoblastos de la función génica y similares. Sin embargo, las estrategias actuales de transferencia génica no distinguen entre las células de un fenotipo de citoblastos y las células que entran en una ruta de diferenciación o las células alimentadoras. Adicionalmente, los métodos actuales son normalmente muy ineficaces y a menudo tóxicos para las iPSC, debido a que las células tienen que tripsinizarse y separarse de las células alimentadoras para permitir la transducción con suficiente eficacia (Jang, J. E. y col., Stem Cells Dev., 2006, 15: 109-17). Solo un fracción menor de las células sobrevive a este procedimiento. Un procedimiento que utiliza la

transducción mediada por vectores de adenovirus permite solo la transferencia génica eficaz cuando las células se cultivan en un medio especial suplementado con un inhibidor de la quinasa Rho (Tashiro, K. y col., Cell Reprogramming, 2010, 12: 501-507). Por tanto, la metodología actual depende de las manipulaciones de las células antes de la transducción, que son complejas y pueden reducir las características de los citoblastos de las células.

5 Gropp, M. y Reubinoff, B. (2006) (Methods in Enzymology, 420, 64 - 81) desvelaron vectores basados en lentivirus para la administración de genes a embriocitoblastos humanos (hESC).

Problema de la invención

Por tanto, el problema de la presente invención es proporcionar medios y/o un procedimiento ahora para conseguir la transferencia génica dirigida en embriocitoblastos humanos indiferenciados y citoblastos pluripotentes inducidos, que evite las desventajas que se mencionan anteriormente y son superiores con respecto a la especificidad y eficacia de la transducción.

10

Sumario de la invención

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

Los inventores desarrollaron novedosas partículas de vectores lentivíricos pseudotipados que comprenden una proteína de fusión de morbilivirus (F) y una proteína hemaglutinina (H) mutada del virus del sarampión (MeV) o la cepa Edmonton del virus del sarampión (MeV_{Edm}), en el que las porciones citoplásmicas de la proteína F y la proteína H están truncadas, y en el que los aminoácidos necesarios para el reconocimiento del receptor en la proteína H están mutados con el fin de que no interactúen con CD46, SLAM y/o la nectina-4 y además tengan un anticuerpo monocatenario contra un marcador de la superficie celular de los hESC e iPSC en su ectodominio. El fragmento variable monocatenario (scFv) dirigido contra la secuencia de codificación del marcador de la superficie celular del anticuerpo monocatenario se fusiona con la secuencia de codificación en el ectodominio de la proteína H, en el que el marcador de la superficie celular se selecciona entre el grupo que consiste en CD30, EpCAM (CD326), CD9, Thy-1 (CD90), SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 o TRA-1-81. La transducción de acuerdo con la presente invención no interfiere con la pluripotencia, es decir, los hESC y los iPSC transducidos actualmente permanecen sin diferenciar, es decir, son capaces de diferenciarse en todos los linajes de la capa germinal.

15

20

25

Los inventores descubrieron que la transducción dirigida deseada de hESC e iPSC mejoró sustancialmente utilizando partículas de vectores lentivíricos pseudotipados con una proteína de fusión de morbilivirus truncada (F) y una proteína hemaglutinina de morbilivirus truncada (H) que expresa además un anticuerpo monocatenario en un marcador superficial de citoblasto en su ectodominio. En este enfoque, el anticuerpo monocatenario es responsable de que solo aquellos citoblastos que se transducen expresen el marcador de la superficie celular respectivo que es reconocido por el anticuerpo. En una realización preferida, el fragmento variable monocatenario (scFv) que se fusiona con el ectodominio de la proteína H es un anticuerpo dirigido contra CD30, un anticuerpo dirigido contra EpCAM (CD326), un anticuerpo dirigido contra CD9, un anticuerpo dirigido contra Thy-1 (CD90), un anticuerpo dirigido contra SSEA-3, un anticuerpo dirigido contra SSEA-4, un anticuerpo dirigido contra TRA-1-60, o un anticuerpo dirigido contra la secuencia de codificación de TRA-1-81, lo más preferible, un anticuerpo dirigido contra la secuencia de codificación de CD30. Estas secuencias de codificación son particularmente adecuadas debido a que la expresión de los marcadores de la superficie celular CD30, EpCAM (CD326), CD9, Thy-1 (CD90), SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, y TRA-1-81 se regulan por defecto rápidamente tras la diferenciación de los hESC e iPSC y la transducción no interfiere con la pluripotencia, es decir, los hESC e iPSC transducidos actualmente son capaces de diferenciarse en todos los linajes de la capa germinal.

30

35

40

Se pueden usar dichos citoblastos transfectados, por ejemplo, como vehículo celular para la terapia génica de suplemento de proteínas y/o para dirigir los citoblastos en linajes concretos. Además, la inserción de construcciones indicadoras específicas de linaje permitiría el aislamiento de células específicas de linaje y permitiría el descubrimiento de fármacos, la validación de la diana, y/o los estudios basados en citoblastos de la función génica y similares.

45

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra la secuencia de aminoácidos del scFV dirigido contra CD30 (hilera de secuencia superior) y los aminoácidos cambiados en el scFV corregido dirigido contra CD30_{opt} (hilera de secuencia inferior). Los aminoácidos críticos en la secuencia marco de scFv están sustituidos por el aminoácido de abajo. Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) del dominio variable de la cadena pesada (V_H, gris claro) y el dominio variable de la cadena ligera (V_L, gris oscuro) y el enlazador entre V_H y V_L (negro) están indicados.

50

La Figura 2 muestra la secuencia de ADN correspondiente ala del scFV corregido/optimizado dirigido contra CD30 de la Fig. 1

Las Figuras 3A-3C muestran de manera ilustrativa la secuencia de ADN de tres de las proteínas H truncadas derivadas del ADN natural (wt) de la proteína H de la cepa Edmonton (H_{Edm}) del virus del sarampión (ADN wt de H_{Edm}), concretamente, HcΔ18, HcΔ19 y HcΔ24+4A, respectivamente. La Figura 3D representa gráficamente de forma ilustrativa la secuencia de aminoácidos de HcΔ18. Las Figuras 3E y 3F muestran de manera ilustrativa la secuencia de ADN y la secuencia de aminoácidos de una de las proteínas F truncadas derivadas del ADN

55

natural (wt) de la proteína F de la cepa Edmonton del virus del sarampión (ADN wt de F_{Edm}), concretamente FcΔ30. Las porciones citoplásmicas se muestran en negrita. La Figura 3G representa gráficamente la secuencia de ADN de la proteína HcΔ24 truncada, en la que se añadieron cuatro restos de alanina adicionales para proporcionar por tanto HcΔ24+4A. De nuevo, Las porciones citoplásmicas se muestran en negrita.

5 Las Figuras 4A y 4B proporcionan una visión general sobre las proteínas F y H mutantes generadas de manera ilustrativa en comparación con sus respectivas moléculas wt, indicando los restos de aminoácidos eliminados (o añadidos) en la porción citoplásmica de las proteínas.

La Figura 5 representa gráficamente la secuencia de aminoácidos de CD30_{opt}.

10 La Figura 6 muestra fotografías microscópicas ilustrativas de las iPSC transducidos con las partículas del vector lentivírico pseudotipadas.

La Figura 7 muestra ejemplos de cuerpos embrioides diferenciados de las células iPS transducidas con CD30_{opt}-LV (panel superior o con un vector lentivírico convencional (VSVG-LV, panel inferior). La fotografía se tomó tres días después que se inició la diferenciación. La morfología que se muestra en el campo claro (paneles de la izquierda) confirma la formación del cuerpo embriode. La fluorescencia verde (paneles de la derecha) confirma que la modificación genética introducida por el vector se ha retenido durante la diferenciación.

Descripción detallada de la invención

Los inventores desarrollaron novedosas partículas de vectores lentivíricos pseudotipados que comprenden una proteína de fusión de morbilivirus (F) y una proteína hemaglutinina (H) mutada del virus del sarampión (MeV) o la cepa Edmonton del virus del sarampión (MeV_{Edm}), en la que las porciones citoplásmicas de la proteína F y de la proteína H están truncadas, y en la que los aminoácidos necesarios para el reconocimiento del receptor en la proteína H están mutados de tal manera que no interactúan con CD46, SLAM y/o la nectina-4 y además tengan un anticuerpo monocatenario contra un marcador de la superficie celular de los hESC e iPSC en su ectodominio.

Además, los inventores descubrieron que la transducción dirigida *in vitro* de hESC e iPSC indiferenciados mejoró sustancialmente utilizando partículas de vectores lentivíricos pseudotipados con una proteína de fusión de morbilivirus truncada (F) y una proteína hemaglutinina de morbilivirus truncada (H) que expresa además un anticuerpo monocatenario en un marcador superficial de citoblasto en su ectodominio.

El término "*in vitro*" se refiere a estudios en biología experimental que se llevan a cabo utilizando componentes de un organismo que se ha aislado de su contexto biológico usual a fin de permitir un análisis más detallado o más conveniente que se pueda llevar a cabo con organismos completos. Por el contrario, el término "*in vivo*" se refiere a un trabajo que se lleva a cabo con organismos vivos en su estado intacto normal, mientras que "*ex vivo*" se refiere a estudios sobre órganos funcionales que se han retirado del organismo intacto.

El término "citoblasto" se refiere a una célula que tiene la capacidad de autorrenovarse, es decir, pasar por numerosos ciclos de división celular manteniendo a la vez el estado indiferenciado, y tiene potencia, es decir, la capacidad de diferenciarse en tipos de células especializadas, por ejemplo, una célula nerviosa o una célula de la piel.

De acuerdo con la presente invención, los "citoblastos pluripotentes indiferenciados" o los "citoblastos pluripotentes" (PSC) son capaces de generar todos los tipos de células del cuerpo, pero no aquellos de la placenta, que se derivan del trofoblasto y las estructuras asociadas. En una realización preferida de la presente invención, las PSC son embriocitoblastos (ESC), más preferentemente embriocitoblastos humanos (hESC). Los hESC pueden obtenerse de blastómeros individuales en embriones humanos sin destrucción de los embriones. Pueden derivarse también de líneas celulares establecidas, que están comercialmente disponibles.

Un tipo de citoblasto pluripotente alternativo se deriva de células somáticas cultivadas *in vitro* que se han revertido a un estado pluripotente análogo al embrionario, es decir, citoblastos pluripotentes inducidos (iPSC). Los iPSC son también capaces de generar todos los tipos de células del cuerpo, pero no del cordón umbilical, los trofoblastos y las estructuras asociadas. Se parecen funcional y fenotípicamente a embriocitoblastos. Existen varias publicaciones y patentes que describen la técnica de reprogramación y los marcadores adecuados (por ejemplo, documentos WO 2010/033084 A1, WO 2009/144008 A1). La reprogramación de acuerdo con la presente invención se lleva a cabo mediante la introducción de genes asociados a citoblastos en células no pluripotentes, es decir, células diferenciadas, preferentemente fibroblastos, tanto mediante transducción como transfección vírica. Los genes asociados a citoblastos se seleccionan entre el grupo que consiste en Klf-4, Sox-2, Oct4, Nanog, LIN-28 y c-Myc, en el que se introducen 3-6 factores, utilizando preferentemente un cóctel de 4 factores (incluyendo Oct4, Sox-2, Nanog y LIN-28).

Las líneas de citoblastos hES incluyen H9 o HES-3. Las líneas de citoblastos iPS preferibles incluyen hCBEC (obtenida mediante transferencia del gen de lentivirus), hFFBiPS SB4 y hFFBiPS SB5 (obtenida mediante transposición "Sleeping Beauty"), en la que las líneas de citoblastos iPS de la presente invención pueden generarse también a partir de pacientes enfermos, tales como de pacientes que tienen inmunodeficiencia combinada grave relacionada con deficiencia en adenosina-desaminasa (ADA-SCID), Distrofia muscular de Duchenne (DMD) y Becker

(BMD), enfermedad de Parkinson (PD) o diabetes mellitus de tipo 1 de inicio juvenil (JDM). Para la terapia génica, estos citoblastos iPS han de transducirse con una copia intacta del gen defectivo y a continuación pueden, tras la diferenciación en el tipo de célula relevante, transferirse a pacientes sin producir una respuesta inmunitaria, como ya se ha descrito por Zhao, T. y col. (Nature, 2011, 474: 212-215). Además, estos citoblastos iPS se pueden usar como un sistema modelo para estrategias terapéuticas de terapia génica. Tras la transducción específica de estas células iPS, puede controlarse la expresión del gen terapéutico tras la diferenciación y se pueden detectar los efectos de las diferentes velocidades de expresión durante la diferenciación. En una realización preferible de la presente invención, las células iPS, derivadas de pacientes con ADA-SCID, se transdujeron con el vector CD30-LV, por tanto, transfiriendo el gen de la adenosina-desaminasa (ADA) funcionalmente activo. A continuación las células se diferenciaron hacia el linaje hematopoyético, en el que las células positivas para CD30 se recogieron y analizaron para la expresión de ADA. A continuación se trasplantaron estas células en ratones inmunodeficientes donde se injertaron y se diferenciaron en todos los linajes del sistema hematopoyético.

Tal como se usa en el presente documento, el término "multipotente" se refiere a la capacidad de diferenciarse solo en un número limitado de tipos. Por ejemplo, la médula ósea contiene citoblastos multipotentes para proporcionar un aumento de todas las células de la sangre pero no de otros tipos de células. Los citoblastos multipotentes se encuentran en organismos adultos, por ejemplo, la mayoría de órganos del cuerpo (por ejemplo, cerebro, hígado, corazón) donde pueden sustituir las células muertas o dañadas.

"Lentivirus" (o "lentivírico") como se usa en la presente invención es un género de las *Orthoretroviridae*, una subfamilia de las *Retroviridae*, en la que los virus de la familia taxonómica *Retroviridae* comparten, como una característica principal, un genoma de ARNm de cadena positiva (mc(+))ARN. La información genética de estos virus se transcribe de forma inversa en primer lugar de ARN en ADN mediante una transcriptasa inversa proporcionada por el virus y posteriormente integrada en el genoma hospedador. Por tanto, el término "retro" se refiere a la actividad de la transcriptasa inversa y a la transferencia de información genética de ARN a ADN. Ya que el genoma vírico es mc(+))ARN, (este (ARNm) puede usarse también directamente por la célula como molde para la producción de proteína.

De acuerdo con la presente invención, el lentivirus (LV) se selecciona entre el grupo que consiste en el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de la inmunodeficiencia de bovino (VIB), el virus de la inmunodeficiencia de felino (VIF), el virus de la inmunodeficiencia de simio (VIS) y el virus de la anemia infecciosa de equino (VAIE), más preferentemente, VIH-1, VIH-2, VIS_{mac}, VIS_{pbj}, VIS_{agm}, VIF y VAIE, e incluso de forma más preferible VIH-1.

Con respecto a la descripción detallada de elementos del lentivirus, se hace referencia a las definiciones correspondientes en el documento WO 2008/037458 A2.

Se pueden proporcionar tres componentes básicos en plásmidos separados, por ejemplo, en un plásmido de expresión de la proteína (por ejemplo, plásmido de expresión de la proteína H o F del virus del sarampión), plásmido de empaquetamiento (por ejemplo, pCMVdR8.9), y/o plásmido de vector de transferencia (por ejemplo, pSEW), para generar partículas de vectores lentivíricos: un gen *gag/pol* psi-negativo, un gen *env* psi-negativo y un vector de expresión psi-positivo. En otra realización preferida, el vector de expresión lentivírica psi-positivo y/o el gen *gag/pol* lentivírico psi-negativo se derivan de un lentivirus seleccionado entre el grupo que consiste en VIH-1, VIH-2, VIS_{mac}, VIS_{pbj}, VIS_{agm}, VIF y VAIE, e incluso de forma más preferible VIH-1.

"partículas de vectores lentivíricos", "partículas de vectores lentivíricos pseudotipados" o más bien "partículas de vectores" como se usa en la presente invención son vectores lentivíricos deficientes en la replicación que son útiles para transducir una secuencia de ácido nucleico en un genoma de una célula hospedadora o diana. Los ejemplos de partículas de vectores lentivíricos pseudotipados se describen en detalle en los documentos 2008/037458 y EP 11 151 018.6 a los cuales se hace referencia. dichas partículas de vectores contienen solo un genoma incompleto del lentivirus a partir del cual se derivan. En detalle, las partículas de vector comprenden un mínimo de las proteínas Gag, Pol y Env y una molécula de ARN (que puede ser un vector de expresión). Las proteínas Gag, Pol, y Env que son necesarias para ensamblar la partícula del vector se derivan del retrovirus y se proporcionan *in trans* por medio de una línea celular de empaquetamiento, preferentemente células 293 de riñón embrionario humano que contienen el antígeno T grande de SV40 (HEK-293T o 293T), la línea de células HT-1080 de sarcoma humano (CCL-121), línea de células Raji análogas a linfoblastos (CCL-86), línea de células U87-MG análogas a glioblastoma-astrocitoma epitelial (HTB-14): línea de células HuT78 de linfoma T (TIB-161), más preferentemente HEK-293T. La molécula de ARN o el vector de expresión se deriva normalmente del genoma del retrovirus original, que significa que comprende todos los elementos necesarios para un empaquetamiento eficaz en las partículas del vector lentivírico resultante (entre otras, el elemento psi y repeticiones terminales largas, LTR). Sin embargo, para que las partículas del vector lentivírico sean deficientes en la replicación, la molécula de ARN no comprende la información genética de al menos uno de los genes *gag*, *env*, o *pol* por sí mismos, en el que los genes o bien se eliminan o bien se evita la expresión de sus productos génicos, preferiblemente una(s) mutación(ones) de cambio de marco.

En otro aspecto preferible, la molécula de ARN no está integrada en el genoma de la célula hospedadora, debido a una integrasa defectiva o a la desaparición de las señales de integración en el ARN. Con este ARN, la proteína codificada se traduce durante un tiempo limitado en la célula transducida, facilitando la diferenciación en un determinado linaje (Sarkis y col., Curr. Gene Ther. 2008, 8(6), págs. 430-437). Como alternativa, no se empaqueta ARN específico, y los vectores se pueden usar para la transferencia de proteína específica (Voelkel y col., PNAS

USA 2010, 107(17), págs. 7805-7810).

Por tanto, En un aspecto preferible, la molécula de ARN de la partícula del vector lentivírico no comprende la información genética de los tres genes mencionados, es decir, los genes *gag*, *env*, o *pol*. En una realización adicional, la molécula de ARN no comprende la información genética de otros genes no esenciales, adicionalmente.

5 En el caso del VIH-1, estos genes no esenciales se seleccionan del grupo que consiste en *tat*, *vif*, *vpr*, *vpu* y *nef*. En cambio, una secuencia de ácido nucleico normalmente heteróloga que se va a integrar en el genoma diana/hospedador ("transgén", es decir, un gen que se va a transducir) está presente en el vector de expresión que está bajo el control de un promotor adecuado, y se expresa por tanto tras la integración del gen en el genoma de la célula hospedadora o diana. La expresión "promotores adecuados" de acuerdo con la presente divulgación se refiere

10 a promotores, que regulan la expresión de los genes constitutivos que están constitutivamente expresados en cualquier tejido, por ejemplo, el gen EF1A1 que codifica la subunidad α del factor de elongación eucariota 1 o el gen que codifica la fosfoglicerato quinasa, y que muestra solo una regulación por defecto leve tras la diferenciación de los citoblastos. Por tanto, el promotor de la presente divulgación puede seleccionarse entre el grupo que consiste en el promotor del citomegalovirus (CMV), el promotor del virus formador del foco del bazo (SFFV), el promotor del factor de elongación 1 alfa (EF1 α) (el promotor EF1 α de 1,2 kb o el promotor EF1 α de 0,2 kb), el promotor EF1 α /IF4 quimérico, y el promotor de la fosfoglicerato quinasa (PGK), en el que se prefieren el promotor EF1 α de 1,2 kb y el promotor SFFV.

En una realización preferida adicional, la partícula del vector lentivírico comprende además un vector de expresión de ARN psi-positivo que comprende el transgén. Preferentemente, el vector de expresión de ARN psi-positivo comprende al menos un gen marcador seleccionable como el transgén.

En general, las expresiones "marcador seleccionable" o "gen marcador seleccionable", como se usan en la presente invención, se refieren a un gen y a su producto correspondiente que permite la detección, selección y/o aislamiento de dicho producto. Si dicho marcador seleccionable se expresa mediante una célula, por consiguiente dicha célula o una población de dichas células se puede detectar, seleccionarse y/o aislarse. Los marcadores seleccionables de acuerdo con la presente divulgación pueden ser, entre otros, una molécula, preferentemente un péptido o proteína, detectable por fluorescencia, una enzima que cataliza una reacción de la cual se controla el producto resultante, o una molécula que confiere una resistencia a, entre otros, un antibiótico. La detección, selección y/o aislamiento puede llevarse a cabo, entre otros, mediante clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), un clasificador celular FACS, uso de microscopio de fluorescencia, uso de microscopio de inmunofluorescencia con anticuerpos primarios y secundarios, o mediante el uso de antibióticos. Por tanto, en una realización preferida de la presente invención dicho gen marcador seleccionable se selecciona entre el grupo que consiste en un gen que codifica GFP (proteína fluorescente verde), un gen que codifica eGFP (GFP potenciada), un gen que codifica una proteína inductora de la apoptosis, un gen que codifica una proteína citotóxica, un gen TNF- α , un gen p53, un ARN interferente, un gen de interferón, el gen de la timidina quinasa del virus del herpes, y un gen que codifica una proteína inmunoestimuladora o terapéutica.

Por tanto, En una realización preferible, las partículas del vector lentivírico se basan en un vector seleccionado entre el grupo que consiste en VIH-1, VIH-2, VIS_{mac}, VIS_{pbj}, VIS_{agm}, VIF y VAIE, e incluso de forma más preferible VIH-1. En una realización adicional, la molécula de ARN de la partícula del vector lentivírico se basa en el genoma del VIH-1 y comprende las LTR, el elemento psi y el promotor de CMV seguido por el gen que se va a transducir, en el que los genes *gag*, *env*, *pol*, *tat*, *vif*, *vpr*, *vpu* y *nef* de VIH-1 se eliminaron o se evitó la expresión de sus productos génicos, y en el que el gen que se va a transducir es un gen marcador seleccionable que se selecciona entre el grupo que consiste en un gen que codifica GFP, un gen que codifica eGFP, un gen que codifica una proteína inductora de la apoptosis, un gen que codifica una proteína citotóxica, un gen TNF- α , un gen p53, un ARN interferente, un gen de interferón, el gen de la timidina quinasa del virus del herpes, y un gen que codifica una proteína inmunoestimuladora o terapéutica.

Para generar las partículas del vector lentivírico, se requieren los tres componentes básicos, usualmente proporcionados en plásmidos separados: un gen *gag/pol* psi-negativo, un gen *env* psi negativo y un vector de expresión psi-positivo. la transfección simultánea de estos componentes en una línea celular de empaquetamiento, es decir, una línea celular eucariota adecuada, por ejemplo, HEK-293T, conduce a la expresión de las proteínas Gag, Pol y Env así como a la generación de ARN psi-positivo. Debido a que los genes *gag/pol* y *env* de la presente divulgación son psi-negativos, el ARNm generado antes de la expresión de las proteínas correspondientes no está ensamblado en las partículas del vector lentivírico. A diferencia de esto, el ARN psi-positivo transcrito a partir del vector de expresión de la presente divulgación se incluye en la partícula del vector lentivírico resultante.

Por consiguiente, las partículas del vector lentivírico deficiente en la replicación de la presente divulgación se generan comprendiendo las proteínas Gag, Pol y Env proporcionadas *in trans* mediante la línea celular de empaquetamiento, preferentemente HEK-293T, así como el transcrito de ARN psi-positivo del plásmido de expresión que carece de la información genética para la replicación autónoma. Sin embargo, dado que las partículas del vector lentivírico comprenden las proteínas Gag, Pol y Env, son capaces de infectar eficazmente sus células diana/hospedadoras, transcriben de forma inversa su ARN, e integran dicha información genética en el genoma de la célula diana/hospedadora.

Para los detalles y condiciones adicionales se hace referencia al documento WO 98/037458 A2, en particular al Ejemplo parte del mismo.

el término "pseudotipado", "vector pseudotipado", o "partícula de vector pseudotipado", "partícula de vector lentivírico

pseudotipado" como se usa en la presente divulgación, se refiere a una partícula de vector que transporta glicoproteínas de la envoltura derivadas de otros virus que tienen envolturas. La gama de hospedadores de los vectores lentivíricos o las partículas de vectores lentivíricos de la presente divulgación pueden por tanto expandirse o alterarse dependiendo del tipo de receptor de la superficie celular usado por la glicoproteína, debido a que dichas partículas de vector poseen el tropismo del virus a partir del cual se derivaron las glicoproteína(s).

Por tanto, En un aspecto preferible, el gen *env* de la partícula de vector lentivírico pseudotipado, que está originalmente derivado del mismo retrovirus que los genes *gag* y *pol* y como la molécula de ARN o vector de expresión, se intercambia por la(s) proteína(s) de la envoltura de un virus de envoltura diferente. En una realización preferida de la presente invención, dicha(s) proteína(s) de envoltura son las glicoproteínas de fusión (F) y la hemaglutinina (H) de un paramixovirus o un morbilivirus, preferentemente el virus del sarampión (MeV), o la cepa Edmonton del virus del sarampión (MeV_{Edm}).

El MeV_{Edm} utiliza uno de los siguientes tres receptores para la entrada de células, concretamente, la proteína conocida por ser el regulador del factor de activación del complemento, CD46 (Gerlier, D. y col., Trends Microbiol., 1995, 3: 338-345), SLAM (molécula de señalización de la activación de linfocitos; conocida también como CD150) o nectina-4, en la que la proteína H, una proteína transmembrana de tipo II, se une a los receptores CD46, SLAM o Nectina-4 del MeV, y a la proteína F, una proteína transmembrana de tipo I, que transporta un péptido de fusión hidrófobo que media en la fusión de la membrana tras la unión de H al receptor.

Por tanto, una función conocida de la proteína F es mediar en la fusión de las membranas víricas con las membranas celulares de la célula hospedadora. Las funciones atribuidas a la proteína H incluyen el reconocimiento del receptor en la membrana diana y el apoyo de la proteína F en su función de fusión de membrana. El mecanismo de la fusión de membrana inducido por MeV puede implicar cambios conformacionales inducidos por el receptor en las proteínas H y a continuación F, que sugieren una interacción dinámica entre estas dos proteínas durante el proceso de transfección.

De acuerdo con la presente invención como se define en las reivindicaciones adjuntas, las proteínas F y H están "truncadas" en sus "porciones citoplásmicas". La expresión "porción citoplásmica", "cola citoplásmica" o "región citoplásmica", como se usa en la presente invención, se refiere a la porción de la proteína respectiva que es adyacente al dominio transmembrana de la proteína y, si la proteína se inserta en la membrana en condiciones fisiológicas, se extiende en el citoplasma. El término "truncado" se refiere generalmente a una delección de restos de aminoácidos de la proteína designada, en el que "truncado" se refiere también a los ácidos nucleicos codificantes correspondientes en una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína "truncada" dada. Además, debe entenderse que las moléculas de ácido nucleico que codifican una específica truncada o una proteína modificada de la presente invención están igualmente abarcadas y viceversa. Por ejemplo, esto significa que si una proteína dada se refiere a, por ejemplo, una proteína F truncada tal como FcΔ30, el ácido nucleico que codifica dicha proteína está igualmente abarcado.

En la presente invención, se hace referencia específicamente a proteínas "H truncadas" o a proteínas "F truncadas", que designan al morbilivirus, preferentemente las proteínas H y F de MeV, respectivamente, cuya porción citoplásmica se ha truncado, es decir, se han eliminado restos de aminoácidos (o ácidos nucleicos codificantes de la molécula de ácido nucleico correspondiente que codifica la proteína). "HcΔX" y "FcΔX" designan dichas proteínas H y F truncadas, respectivamente, en el que "X" se refiere a 1-50 restos, que se han eliminado de la porción citoplásmica, respectivamente, más preferentemente 25-30 restos de FcΔX y 10-25 restos de HcΔX. Por tanto, en una reacción adicional e incluso más preferida, la "proteína F truncada" es FcΔ24 o FcΔ30 y/o la "proteína H truncada" se selecciona entre el grupo que consiste en HcΔ14, HcΔ15, HcΔ16, HcΔ17, HcΔ18, HcΔ19, HcΔ20, HcΔ21+A, y HcΔ24+4A, más preferentemente HcΔ18, HcΔ19 y HcΔ24+4A.

En un aspecto preferible, la porción citoplásmica truncada de la proteína F comprende al menos un resto de aminoácido cargado positivamente, en el que la porción citoplásmica truncada de la proteína H está truncada para permitir un pseudotipado eficaz y tiene una función de apoyo a la fusión. En un aspecto preferido adicional, la porción citoplásmica truncada de la proteína H comprende al menos nueve restos de aminoácidos consecutivos de la porción citoplásmica del extremo C de la proteína H más una metionina adicional en el extremo N. En otro e incluso más preferido aspecto, la porción citoplásmica truncada de la proteína F comprende al menos tres restos de aminoácidos consecutivos de la porción citoplásmica del extremo N de la proteína F y la porción citoplásmica truncada de la proteína H comprende al menos 13 restos de aminoácidos consecutivos de la porción citoplásmica del extremo C de la proteína H más una metionina adicional en el extremo N, en el que uno a cuatro restos de aminoácidos en el extremo N de dichos al menos 13 restos de aminoácidos consecutivos de la porción citoplásmica del extremo C de la proteína H pueden estar sustituidos por restos de alanina. Además, la porción citoplásmica de la proteína F de la presente divulgación se localiza en el extremo C de la proteína.

Por tanto, en un aspecto adicional e incluso más preferido, el uno o dos vectores de expresión psi-negativos) codifican la proteína F truncada FcΔ24 o FcΔ30 y/o la proteína H truncada que se selecciona entre el grupo que consiste en HcΔ14, HcΔ15, HcΔ16, HcΔ17, HcΔ18, HcΔ19, HcΔ20, HcΔ21+A, y HcΔ24+4A, más preferentemente HcΔ18, HcΔ19 y HcΔ24+4A. a este respecto, se hace referencia a las Figs. 3 y 4.

Normalmente, las partículas del vector lentivírico ya pseudotipado con las proteínas F y H del morbilivirus pueden utilizarse para transducir eficazmente células (o líneas celulares) que transportan al menos uno de los tres receptores de MeV, CD46, SLAM, y nectina-4. Sin embargo, de acuerdo con la presente divulgación, la proteína H

es una proteína truncada y mutada ("HcΔX", "Hmut" o más bien "HmutΔX") que no interactúa con CD46, SLAM, y/o nectina-4. En una realización de la presente invención, la mutación para suprimir/prevenir la interacción de la proteína H con CD46 se introdujo mediante las mutaciones puntuales Y481A y R533A de la proteína H de MeV. En otro aspecto, la proteína Hmut incluye también las mutaciones S548L y F549S, que conducen a una supresión más completa de la reactividad residual mediante CD46. Asimismo, la mutación de los restos V451 e Y529 suprime la interacción productiva con CD46. Las mutaciones alternativas para suprimir/prevenir la interacción de la proteína H con CD46 se refieren a proteínas H que tienen Y481 sustituido con cualquier otro aminoácido, en particular con metionina o glutamina, o que tienen mutaciones en una posición seleccionada entre F431, V451, Y452, A527, P486, I487, A428, L464, G546, S548, F549 en el que estos aminoácidos se sustituyen con otro aminoácido y esta mutación previene o ayuda a prevenir la interacción de la proteína H con CD46. Como alternativa, la sustitución de los cinco restos consecutivos 473 a 477 en la proteína H con alanina puede prevenir la interacción de la proteína con CD46. Para prevenir la interacción de la proteína H con SLAM, se puede sustituir uno de los siguientes restos con cualquier otro aminoácido, en particular, alanina: 1194, D530, Y553, T531, P554, F552, D505, D507. Además, las mutaciones alternativas para suprimir/prevenir la interacción de la proteína H de MeV con nectina-4 de acuerdo con la presente invención se refieren a los restos Y543 y P497, preferentemente Y543A o P497S y Y543A.

Por tanto, en un aspecto preferido adicional, la proteína H contiene al menos una mutación para suprimir/prevenir la interacción de la proteína H con al menos uno de los receptores CD46 de CD46, SLAM y/o nectina-4, preferentemente, la proteína H contiene dos o tres mutaciones.

En una realización, la mutación para suprimir/prevenir la interacción de la proteína H con CD46 es una mutación puntual con otro aminoácido de al menos uno de los restos seleccionados entre el grupo que consiste en V451, Y529, Y481, F431, V451, Y452, A527, P486, I487, A428, L464, R533, G546, S548 y F549, en particular con alanina, leucina, serina, metionina, glutamina, por ejemplo, Y481A, R533A, S548L y/o F549S; o Y481 sustituido con metionina o glutamina. En una realización alternativa, los cinco restos consecutivos 473 a 477 se sustituyen con alanina en la proteína H para suprimir/prevenir la interacción de la proteína H con CD46.

En otra realización preferida, la mutación para suprimir/prevenir la interacción de la proteína H con SLAM es una mutación puntual con otro aminoácido, preferentemente alanina, en al menos uno de los restos seleccionados entre el grupo que consiste en 1194, D530, Y553, T531, P554, F552, D505 y D507.

En una realización adicional, las mutaciones para suprimir/prevenir la interacción de la proteína H de MeV con nectina-4 se refieren a los restos Y543 y P497, preferentemente Y543A o P497S y Y543A.

Los detalles adicionales que se refiere a las proteínas F y H truncadas y a las mutaciones se pueden derivar de WO 98/037458 A2. Además, La persona experta en la materia será fácilmente capaz de introducir mutaciones como, por ejemplo, adiciones y deleciones, en un ácido nucleico o secuencia de aminoácidos dada. Dichas metodologías conocidas se desvelan, por ejemplo, en Sambrook, J. y col., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory (1989).

Además, se han encontrado que la relación entre la cantidad de plásmido que codifica la proteína F y H truncada, respectivamente, usada para la producción de las partículas de los vectores lentivíricos pseudotipados tiene un significativo efecto de los títulos de las partículas de vectores resultantes. Esto significa que una cantidad creciente de plásmido que codifica la proteína F truncada en comparación con la cantidad de plásmido que codifica la proteína H truncada conduce a un aumento de los títulos y a un aumento de la eficacia de la transducción de las partículas de vectores víricos pseudotipados. En una realización preferida de la presente divulgación, la cantidad de la proteína F truncada es de 10-100 %, 100-250 %, 250-500 %, 500-750 %, 750-1000 %, o más de 1000 % mayor y, preferentemente, 300 % mayor que la cantidad de proteína H truncada.

Los términos "títulos" y "eficacia de la transducción" como se usa en la presente invención se refieren a la capacidad de una partícula de vector de penetrar en una célula e integrar la información genética, en particular, la información de ARN, en el genoma de la célula. Por tanto, Los términos "título" y "eficacia de la transducción" se pueden usar de forma sinónima. Se pueden determinar el título/eficacia de la transducción, por ejemplo, mediante la incorporación de un gen que codifica un marcador seleccionable, por ejemplo, bajo el control de un promotor de CMV, en el vector de expresión de la partícula del vector. Tras la transducción de dicho marcador seleccionable por medio de la partícula del vector, las células transducidas expresarán el marcador seleccionable. Si el marcador seleccionable es, por ejemplo, la proteína GFP, el número de células infectadas por un número dado de partículas de vectores pueden determinarse fácilmente, por ejemplo, mediante análisis FACS, y corresponde directamente al título o la eficacia de la transducción de las partículas de vectores que se han usado para la transducción. El título o la eficacia de la transducción de una partícula de vector dada se refiere por tanto al número de células transducidas con respecto al número de partículas de vectores usadas. Por tanto, una suspensión de partículas de vectores que tienen un "título creciente" o una "eficacia de la transducción aumentada" es capaz de transducir un número mayor de células en una concentración dada de partículas de vectores que una suspensión diferente de partículas diferentes que tienen la misma concentración de partículas de vectores. En una realización preferible de la presente invención, el título del depósito madre de virus se usa entre 1×10^6 y 1×10^8 u.i./ml para la transducción de 1×10^4 a 1×10^6 células iPS.

De acuerdo con la presente invención como se define en las reivindicaciones adjuntas, la proteína H mutada y truncada presenta además un anticuerpo monocatenario en su ectodominio (es decir, en el extremo C), es decir, H-scFv en el que el anticuerpo monocatenario se dirige contra a se une a un "marcador de la superficie celular" o más

bien "marcador celular" que se refiere a una molécula presente sobre la superficie de un citoblasto. Esto representa una construcción de fusión o, en otras palabras, una proteína quimérica. Dichas moléculas pueden ser generalmente, entre otros, péptidos o proteínas que pueden comprender cadenas de azúcares o lípidos, antígenos, agrupaciones de diferenciación (CD), antígenos, anticuerpos o receptores. Debido a que no todas las poblaciones de células expresan los mismos marcadores celulares, se puede usar por tanto un marcador celular para identificar, seleccionar o aislar una población dada de células que expresan un marcador celular específico. Por tanto, Las expresiones "entrada de células dirigida" o partículas de vectores lentivíricos "dirigidas" como se usa en la presente invención se refiere a partículas de vectores lentivíricos pseudotipados, en el que la proteína H está mutada y tiene además un anticuerpo monocatenario en un marcador de la superficie celular en su ectodominio, es decir, fusionando el fragmento variable monocatenario (scFv) dirigido contra el marcador de la superficie celular que codifica la secuencia de la secuencia de codificación de la proteína H. Por lo tanto, la gama de hospedadores de las partículas de vectores lentivíricos dirigidas a la entrada de células de la presente invención no se expande o altera, dependiendo del tropismo del virus, se deriva la proteína H, pero, dependiendo de la especificidad del anticuerpo monocatenario fusionado con la proteína H.

De acuerdo con la presente invención, los marcadores de la superficie celular se seleccionan entre el grupo que consiste en CD30, EpCAM (CD326), CD9, Thy-1 (CD90), SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, y TRA-1-81, que están regulados por defecto por la diferenciación de los citoblastos. En una realización preferida, la proteína H mutada y truncada presenta además un anticuerpo monocatenario en su ectodominio que se dirige contra o se une al marcador de la superficie celular CD30.

CD30 es un miembro de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral, identificado originalmente como marcador superficial de células malignas en la enfermedad de Hodgkin (Schwab, U. y col., *Nature*, 1982, 299: 65-67). La función biológica de CD30 en los citoblastos es todavía desconocida, aunque se notificó su implicación en la protección de los citoblastos contra la apoptosis por Herszfeld, D. y col. (*Nat. Biotechnol.*, 2006, 24: 351-357). Además, Grandela, C. y E. Wolvetang (*Stem Cell Rev.*, 2007, 3: 183-191) observaron que los citoblastos positivos para CD30 muestran una expresión reducida de p53 (mediador de la apoptosis) y una expresión creciente de *SURVIVIN* (inhibidor de la apoptosis).

Con respecto a su expresión, se ha notificado que CD30 se expresa fuertemente en carcinomas embrionicos (Pera, M. F. y col., *Lab. Invest.*, 1997, 76: 497-504) pero estaba ausente de la mayoría de tejido adulto y embrionario. A pesar de algunos resultados contradictorios con respecto a la expresión de CD30 en citoblastos (Herszfeld, D. y col., *Nat. Biotechnol.*, 2006, 24: 351-357; Grandela, C. y E. Wolvetang, *Stem Cell Rev.*, 2007, 3: 183-191; Mateizel, I. y col., *Human Reproduction*, 2009, 24: 2477-2489) es indiscutible que la expresión de CD30 está regulada por defecto durante la diferenciación espontánea de los citoblastos (Mateizel, I. y col., *Human Reproduction*, 2009, 24: 2477-2489; Lagarkova, M. A. y col., *Cell Cycle*, 2008, 7: 3610-3612). Por tanto, CD30 de acuerdo con la presente divulgación representa un marcador de hESC e iPSC pluripotentes indiferenciadas. Los presentes inventores encontraron que el scFvCD30 conocido debe estar preferentemente mutado para mejorar la expresión superficial y el título de la partícula del vector lentivírico dirigida producida, preferentemente por mutaciones puntuales en las posiciones de aminoácidos 5, 11, 12, 20, 50, 51, y/o 70 en la cadena V_H, más preferentemente Q5V, L11D, A12V, M20L, H50Q, D51G y/o N70K; y en las posiciones de aminoácidos 3, 4, 10, 20, 21, 23, 36, 98, y/o 104, más preferentemente E3V, L4M, F10S, N20T, V21I, Y23C, F36Y, S98P, E103T, y/o F105Y en la cadena V_L. La secuencia de aminoácidos del scFv dirigido contra CD30 y la secuencia de aminoácidos corregida/optimizada se muestran en la Fig. 1 y 5.

La molécula de adhesión celular epitelial (EpCAM) es una proteína de adhesión celular homofílica, expresada principalmente en el epitelio fuertemente replicativo, similar a la mucosa o a la capa basal de la piel. Durante la embriogénesis, se expresa en precursores de por ejemplo, hepatocitos (De Boer, C. J. y col., *J. Pathol.*, 1999, 188: 201-206) pero no en células adultas. Su expresión *de novo* en todos los carcinomas (Roovers, R. C., y col., *Br. J. Cancer*, 1998, 78: 1407-1416) se asocia con la desdiferenciación y la proliferación potenciada de células tumorales. Además, la expresión de EpCAM se asocia con el mantenimiento del fenotipo indiferenciado de las células hES (Lu, T.-Y., y col., *J. Biol. Chem.*, 2010 285: 8719-8732). Por tanto, EpCAM de acuerdo con la presente divulgación representa un marcador de hESC e iPSC pluripotentes indiferenciados.

El scFv que reconoce EpCAM se describe por (Willuda, J. y col., *Cancer Res.*, 1999, 59: 5758-5767). Se puede llevar a cabo la clonación de la proteína de fusión H-scFv de acuerdo con la presente divulgación tras el procedimiento que se ha descrito ya por Anliker, B. y col. (*Nat. Methods*, 2010, 7: 929-935), en el que la transducción específica de células positivas para EpCAM demuestra la especificidad de la diana y los títulos adecuados.

CD9 (TG30) es una tetraspanina y se describe que está implicada en la adhesión celular (Masellis-Smith, A. y A. R. Shaw, *J. Immunol.*, 1994, 152: 2768-2777), motilidad y metástasis (Ikeyama, S. y col., *J. Exp. Med.*, 1993, 177: 1231-1237). Además, tiene un papel en la fusión del esperma con el óvulo (Higginbottom, A. y col., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003, 311: 208-214) y se relaciona en "The International Stem Cell Initiative" (*Nat. Biotechnol.*, 2007, 25: 803-816) como marcador de las células hES. Por tanto, CD9 es una proteína de la superficie celular conocida por funcionar durante el desarrollo, crecimiento y motilidad celular y está regulada por defecto en la diferenciación de hPSC, Por lo cual CD9 de acuerdo con la presente divulgación representa un marcador de hESC e iPSC pluripotentes indiferenciados.

Thy-1 (CD90) es una proteína transmembrana de paso único con un dominio de tipo V análogo a Ig (análogo a inmunoglobulina) y se describe también que se va a expresar en células precursoras hematopoyéticas (Craig, W. y col., *J. Exp. Med.*, 1993, 177: 1331-1342). Por tanto, CD90 puede considerarse como un marcador alternativo para

diversos tipos de citoblastos (por ejemplo, hemocitoblastos o células hES, incluyendo hESC e iPSC pluripotentes indiferenciados. los antígenos 3 y 4 embrionarios específicos de etapa (SSEA-3 y SSEA-4) son dos epítomos diferentes en el mismo glicolípido presentes exclusivamente en células hES o iPS (Thomson, J. A. y col., Science, 1998, 282: 1145-1147) o células de carcinoma embrionario, que se regulan por defecto tras la diferenciación (Draper, J.S. y col., J. Anat., 2002, 200(Pt 3): 249-258). Por tanto, SSEA-3 y SSEA-4 de acuerdo con la presente divulgación representan un marcador de hESC e iPSC pluripotentes indiferenciados.

En resumen, las partículas del vector lentivírico pseudotipado, con una proteína F truncada (por ejemplo FcΔ30) y una proteína H mutada (por ejemplo, "HmutΔ18") presentan adicionalmente un anticuerpo monocatenario en la superficie celular en su ectodominio, por ejemplo, scFvCD30, scFvEpCAM (scFvCD326), scFvCD9, scFvThy-1 (scFvCD90), scFvSSEA-3, scFvSSEA-4, TRA-1-60, o TRA-1-81, no entran células más largas debido a CD46, SLAM, y/o nectina-4, sino más bien se dirigen a y entran solo aquellas células que presentan los marcadores correspondientes respectivos en su superficie. Esto significa que los títulos están significativamente reducidos en las células que no expresan estos marcadores. Por lo tanto, la entrada y la transducción de células usando las partículas del vector lentivírico pseudotipado de la presente divulgación representa un medio eficiente y eficaz para transferir un gen muy selectivo en células específicas, es decir, para la transducción dirigida de células específicas. De acuerdo con la presente divulgación, dichas células son citoblastos, más preferentemente citoblastos pluripotentes indiferenciados, en el que los citoblastos se seleccionan del grupo que consiste en hESC e iPSC.

El término "diferenciación" o "ruta de diferenciación" que se usa en la presente divulgación se refiere a la ruta seguida por un citoblasto a medida que se dirige hacia un linaje específico o un tipo de célula madura y comienza así con un citoblasto indiferenciado y termina con un linaje específico o maduro, una célula diferenciada. Un citoblasto que sigue dicha ruta puede pasar a través de muchas etapas, en el que se piensa que los "citoblastos pluripotentes indiferenciados" o más bien, los "citoblastos pluripotentes" tienen el potencial para diferenciarse en casi cualquier tipo de célula, mientras que se cree que los "citoblastos multipotentes indiferenciados" tienen el potencial de diferenciarse solo en muchos tipos de células. Debido a que la expresión de CD30, EpCAM (CD326), CD9, Thy-1 (CD90), SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, y TRA-1-81 es indetectable en las áreas de diferenciación, la expresión de CD30, EpCAM (CD326), CD9, Thy-1 (CD90), SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, y TRA-1-81 refleja el estado indiferenciado de los citoblastos. Por tanto, las partículas de vectores lentivíricos pseudotipados de la presente divulgación transducen específicamente (es decir, transducción dirigida) los citoblastos positivos para CD30, EpCAM (CD326), CD9, Thy-1 (CD90), SSEA-3, o SSEA-4, TRA-1-60, y TRA-1-81 pluripotentes indiferenciados, más preferentemente los embriocitoblastos humanos (hESC) y los citoblastos pluripotentes inducidos (iPSC), en el que la transducción dirigida actual de estas células no interfiere con su pluripotencia. Por tanto, dependiendo del transgén de la presente divulgación, puede evitarse el silenciamiento del transgén que se produce en el tiempo o tras la diferenciación del citoblasto.

Para resumir, la presente invención se basa en el hallazgo inesperado y sorprendente de que la incorporación de morbilivirus, preferentemente MeV, a las proteínas F y H que tienen colas citoplásmicas truncadas en partículas de vectores lentivíricos, y la interacción del complejo de estas dos proteínas durante la fusión celular, permite una transducción superior y más eficaz de las células, y el virus del sarampión se caracteriza por una fusión de membrana directa y muy eficaz. Además, estas partículas de vectores pseudotipados permiten la transferencia génica dirigida o más bien la transducción génica de los citoblastos positivos para CD30, EpCAM (CD326), CD9, Thy-1 (CD90), SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, y TRA-1-81, más preferentemente los embriocitoblastos humanos (hESC) y los citoblastos pluripotentes inducidos (iPSC), ya que la expresión de CD30, EpCAM (CD326), CD9, Thy-1 (CD90), SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, y TRA-1-81 se regula rápidamente por defecto tras la diferenciación de hESC e iPSC. Por tanto, los títulos y la eficacia de la transducción de las partículas de vectores lentivíricos pseudotipados de la presente divulgación están aumentadas significativamente y solo se transducen citoblastos multipotentes, de tal manera que los transgenes no se silencian tras la diferenciación de los citoblastos. Los vectores lentivíricos específicos que se dirigen a la molécula CD30 EpCAM (CD326), CD9, Thy-1 (CD90), SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, o TRA-1-81 con CD30-, EpCAM (CD326)-, CD9-, Thy-1 (CD90)-, SSEA-3-, SSEA-4-, TRA-1-60, o TRA-1-81son muy eficaces y estrictamente específicos. Como se muestra en la parte del ejemplo, fue posible con esta estrategia que solo colonias de iPSC que expresan Oct4 (un marcador de citoblastos bien conocido) expresen el gen del marcador (por ejemplo GFP) tras la transducción con las partículas de vectores lentivíricos positivas para CD30, EpCAM (CD326), CD9, Thy-1 (CD90), SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, o TRA-1-81. Se pueden incluir otros marcadores de citoblastos en las realizaciones de la presente divulgación, por ejemplo, Sox-2, Nanog, así como la expresión y actividad de la fosfatasa alcalina (una enzima que es solo activa en tipos de células pluripotentes). Esto es una gran ventaja debido a que las tecnologías de transducción de la técnica anterior no pueden discriminar ningún citoblasto de las células alimentadoras ni de las células diferenciadas, ya que se producen normalmente durante el cultivo de los iPSC.

La presente divulgación es particularmente adecuada para la investigación básica, por ejemplo, la genómica funcional, así como para las aplicaciones terapéuticas de los iPSC. El procedimiento inventado es más rápido, más fácil de manipular y más suave para las células que los protocolos del estado de la técnica. Además, se requerirán unas pocas células. Con respecto a los iPSC que son una población de células mixtas no homogénea compuesta de células pluripotentes, células diferenciadas y células indiferenciadas, es una ventaja que con la presente divulgación es posible distinguir entre células que expresan determinados marcadores (por ejemplo, CD30, EpCAM (CD326), CD9, Thy-1 (CD90), SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 o TRA-1-81) y transducir selectiva y específicamente estas células, en el que la transducción dirigida actual no interfiere con la pluripotencia, es decir, los hESC e iPSC

transducidos presentes son capaces de diferenciarse en tipos de células de las tres capas germinales que se pueden ensayar utilizando diferentes genes marcadores de las capas germinales, por ejemplo β -tubulina o citoqueratina-18 para el ectodermo; α -fetoproteína (AFP), secuencia Y 17 de la región determinante del sexo (SOX-17) o el factor-4 nuclear de los hepatocitos (HNF4) para el endodermo; desmina o CD31 para el mesodermo.

- 5 La invención se describe además mediante los siguientes Ejemplos. Los Ejemplos que no se encuentran comprendidos en el ámbito de las reivindicaciones son solo a fines ilustrativos.

Ejemplos

Ejemplo 1: producción y aislamiento de partículas de vectores lentivíricos pseudotipados que expresan scFV-CD30

- 10 como se describe en el documento WO/2008/037458, la secuencia que codifica el scFv dirigido contra CD30 se fusionó genéticamente con la secuencia codificante modificada de la proteína hemaglutinina (H) del virus del sarampión. El marco de scFv se modificó como se ha descrito en la solicitud de patente previa EP2476754. El clon pHL3-CD30mut2 n.º 2 medió un título alto y se usó para experimentos adicionales. El procedimiento de transfección para la producción de partículas de vectores se describe en Anliker, B. y col. (Nat. Methods, 2010, 7: 929-935). En
15 resumen, las células HEK-293T se transfectaron usando polietilenimina (PEI). A tal fin, $1,5 \times 10^7$ células se sembraron 24 h antes de la transfección en un matraz T175. Antes de la transfección, el medio se sustituyó con 15 ml de medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con glutamina 2 mM. En total, 2,6 μ g del plásmido de expresión de la proteína H del virus del sarampión, 8 μ g del plásmido de expresión de la proteína de fusión (F) del virus del sarampión, 28,7 μ g del plásmido de empaquetamiento pCMVdR8.9 y 30,2 μ g del plásmido del vector de transferencia pSEW se mezclaron con 310 μ l de glucosa al 5 % (peso/vol). En paralelo, se mezclaron 70 μ l de PEI 18 mM y 310 μ l de glucosa al 5 %. Ambas mezclas se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente (25 °C), se sometieron a vortización combinada y se incubaron durante 10 min más a temperatura ambiente. Tras
20 añadir 1 ml de DMEM suplementado con glutamina 2 mM, se añadió la mezcla a las células. Después de 4 h, se añadieron 2 ml de FCS. El sobrenadante celular que contenía las partículas pseudotipadas se filtró 48 h después (filtro de 0,45- μ m) y se concentró mediante ultracentrifugación sobre una capa de sacarosa al 20 % (peso/vol) (100.000 g durante 3 h a 4 °C). El sobrenadante se descartó y se resuspendió el aglomerado en 150 μ l de medio sérico reducido (Opti-MEM) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). Los depósitos madre de partículas de vectores se titularon sobre una línea de células HuT78. Se determinaron las células que expresaban eGFP (células eGFP+) mediante el análisis FACS y se calcularon los títulos.
- 25 Se llevaron a cabo experimentos similares utilizando el clon pHL3-CD30_{opt}, que mostró buenos títulos similares como el CD30mut n.º 2 anteriormente mencionado.

Ejemplo 2: Cultivo y transducción de iPSC

- 35 las células iPSC se mantuvieron en una capa del alimentador inactivada de fibroblastos embrionarios de murino en presencia de suero de sustitución inactivado (KO) al 20 %, aminoácidos no esenciales 1 mM, L-glutamina 1 mM, β -mercaptoetanol 0,1 mM, 50 U penicilina/50 μ g de estreptomicina (Pen/Estrep) y 8 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF o FGF2) en KO-DMEM. Para el subcultivo, se retiró el medio y se añadió colagenasa (2 mg/ml de Colagenasa de Tipo IV en KO-DMEM) durante 5 min para disolver las colonias de citoblastos de la capa del alimentador. Posteriormente, se añadió 1 ml de medio para lavar las colonias de la capa de alimentador y se concentraron las colonias mediante centrifugación (3 min, 800 rpm, 4 °C). El aglomerado celular se volvió a suspender en una cantidad adecuada de medio reciente y se distribuyó en placas de alimentador recientes.

- 40 Para la transducción de células iPSC, se sembró una cantidad adecuada de colonias dos días antes de la transducción. A 1 ml de medio de cultivo celular, se añadieron 10 μ l de depósito madre de vectores (título: 1×10^7 u.i./ml) dando como resultado una multiplicidad de infección (MOI) de 2 cuando están presentes 5×10^4 células iPSC el pocillo. Como alternativa, se añadió el depósito madre de vectores a las células antes de la distribución de placas de alimentador recientes.

- 45 Tras la transducción, se cultivaron las células durante otros 4 días hasta que la expresión de GFP derivada del gen indicador transferido llegó a ser detectable. Un número razonable de células transducidas fueron detectables ya tras añadir el CD30.LV directamente a las células cultivadas. Las células se fijaron con formaldehído al 4 % en PBS a temperatura ambiente durante 15 min para el análisis de la inmunofluorescencia. El marcador Oct4 se visualizó en paralelo a la expresión de GFP por un anticuerpo Oct3/4 de santa Cruz (incubación a temperatura ambiente durante una hora) y un anticuerpo de cabra secundario dirigido contra Ig de ratón (Alexa-647; 1:1000) tras una incubación a temperatura ambiente durante 30 min.

Ejemplo 3: Partículas de vectores lentivíricos dirigidas a la entrada de células que se dirigen a células que expresan CD30

- 55 $1,6 \times 10^5$ de las líneas de células iPSC hFFBiPS SB4 y hFFBiPS SB5 se sembraron sobre una capa de alimentador de fibroblastos de embriones de ratón en una placa de 24 pocillos. La transducción seguida 24 h después con vectores lentivíricos pseudotipados con la proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G) (VSV-G-LV) y CD30_{opt}-LV

(MOI de 0,1; 1 y 10 [solo VSV-G-LV]) en 500 µl de medio de citoblastos. Después de 6 h, se cambió el medio y se cultivaron las células durante 120 h. se analizó la expresión de eGFP de las células transducidas mediante el microscopio de fluorescencia (Figura 6A). Para las fotografías de inmunofluorescencia que muestran Oct4, CD30 o SSEA-4, se sembraron las células en cubres y se transdujeron a una MOI de 0,1. A continuación se lavaron las células con PBS una vez, se fijaron durante 15 min con formaldehído al 4 % en PBS y se permeabilizaron con Triton X-100 al 1 % durante 10 min a temperatura ambiente (TA). Se bloquearon los sitios de unión no específicos con albúmina de suero bovino al 5 % (BSA)/Triton X-100 al 0,1 % en PBS durante 30 min a TA. Los anticuerpos primarios se usaron 1:500 en PBS con BSA al 5 % y se incubaron con las células durante 1 h a TA. Se lavaron las células tres veces con PBS durante 5 min y a continuación se incubaron de acuerdo con los anticuerpos secundarios (diluidos 1: 1000 in PBS) durante 30 min a TA en la oscuridad. Tras lavar con PBS (tres veces, 5 min), los núcleos se tiñeron con 4'6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (1 µg/ml en PBS) durante 1 min y se lavaron de nuevo tres veces durante 10 min. se montaron los cubres sobre portas con Aqua-polymount (Polysciences Europe GmbH, Eppelheim, Alemania) y se almacenaron a 4 °C hasta el análisis.

Ejemplo 4: Promotores diferentes adecuados para la expresión del transgén tras la diferenciación

La transducción de células iPS con vectores directores lentivíricos no debe interferir con la pluripotencia de las células. Por lo tanto, las células transducidas debe demostrarse que se diferencian en todos los linajes de la capa germinal. Esto se puede demostrar por la formación del cuerpo embriode en el cultivo de células, o la formación del teratoma tras la inyección en ratones inmunodeficientes. A pesar de que el promotor SFFV está silenciado durante la diferenciación, se han ensayado cuatro promotores diferentes: el promotor EF1α de 1,2 kb, el promotor EF1α/IF4 quimérico de 0,4 kb, el promotor EF1α corto de 0,2 kb y el promotor PGK. Para ensayar la expresión de un gen marcador bajo el control de estos diferentes promotores, 1×10^5 líneas de células derivadas de diferentes tejidos humanos (293T, HT1080, Raji, U87-MG y HuT78) se han transducido con VSV-G-LV a una MOI de 0,1 y se analizó la expresión de GFP después de 96 h. en todas las líneas de células, el promotor EF1α de 1,2 kb mostró una fuerte actividad similar como el promotor SFFV y se usó para la transducción de células iPS.

Ejemplo 5: Diferenciación de iPS en los cuerpos y linajes embrioides de las tres capas germinales tras la transferencia del gen marcador

De acuerdo con un protocolo de Cerdan, C. y col.(Curr. Protoc. Stem Cell Biol. 2007, 1:1D.2.1-1D.2.16), se hicieron crecer células iPS en seis pocillo en la capa de alimentador en 3 ml de medio de embriocitoblastos (ESC) (40 ml de KnockOut-DMEM, 10 ml de suero KnockOut de sustitución, 0,5 ml de medio de aminoácidos MEM no esencial, 0,25 ml de L-glutamina, 0,25 ml Pen/Estrep, 0,1 µl de 2-mercaptoetanol, 4 ng/µl de FGF2) hasta que forman colonias y expresan Oct4 uniformemente. Cuando las células iPS estuvieron listas para el subcultivo, se inició la diferenciación. Para inducir la formación de cuerpos embrioides (EB), se despegaron las células iPS en una placa de seis pocillos del alimentador utilizando 1 mg/ml de colagenasa (de Tipo IV). A tal fin, se aspiró el medio, se añadió 1 ml de colagenasa a cada pocillo y se incubaron las células durante 5 min a 37 °C. se añadieron 2 ml de medio ESC a cada pocillo y las colonias se despegaron cuidadosamente del alimentador usando una pipeta de 1 ml.

Las colonias se transfirieron a un tubo de 15 ml y se centrifugaron durante 3 min a 800 rpm. Se aspiró el sobrenadante y las células iPS se volvieron a suspender en medio EB (80 ml de DMEM KnockOut, 20 ml de FCS, 0,5 ml de L-glutamina, 0,67 µl de 2-mercaptoetanol, 1 ml de ácido ascórbico (5 mg/ml), 0,67 ml de holotransferrina (30 mg/ml). Se transfirieron 3 ml de suspensión celular a placas de unión ultrabaja y se incubaron a 37 °C. Se intercambié el medio cada 2 días. La formación general de EB se detuvo después de 10 días de diferenciación y se controló la expresión de GFP. La Figura 7 muestra ejemplos de cuerpos embrioides diferenciados de las células iPS transducidas con CD30opt-LV (panel superior o con un vector lentivírico convencional (VSVG-LV, panel inferior). La fotografía se tomó tres días después que se inició la diferenciación. La morfología que se muestra en el campo claro (paneles de la izquierda) confirma la formación del cuerpo embriode. La fluorescencia verde (paneles de la derecha) confirma que la modificación genética introducida por el vector se ha retenido durante la diferenciación.

Para controlar la expresión de los genes marcadores de las tres capas germinales, se extrajo el ARN en diferentes puntos temporales durante la diferenciación y la PCR mediante transcriptasa inversa (RT)-PCR se llevó a cabo con parejas de cebadores específicas de diferentes genes marcadores de la capa germinal (ectodermo: β-tubulina, citoqueratina 18; endodermo: AFP, SOX-17, HNF4; mesodermo: desmina, CD31).

Para inducir la diferenciación de las células iPS en las motoneuronas espinales, se aplicó un protocolo publicado por Hu, B. Y. y S. C. Zhang (Nat. Protoc., 2009, 4:1295-1304). Para la diferenciación, se han utilizado las siguientes etapas: Inducción de células del neuroectodermo primitivo (NE) (días 0-10), especificación del factor de transcripción hélice-bucle-hélice básico Olig2 que expresa los progenitores de las motoneuronas (días 10-28), generación de neuronas motoras espinales por diferenciación en el sustrato (días 28-35) y maduración de las neuronas motoras espinales en el sustrato (días 42-56). A tal fin, las células iPS se despegaron de la capa del alimentador de los fibroblastos embrionicos de ratón (MEF) utilizando colagenasa de tipo IV, se recogieron en un tubo de 15 ml y se centrifugaron durante 1 min a 50 g y temperatura ambiente. a continuación se transfirieron las colonias a matraces T75 y se cultivaron a 37 °C en medio ESC sin FGF2. Se intercambié el medio en días alternos. Se intercambié el medio en el día 7 para el medio de diferenciación neural (484 ml de medio DMEM con mezcla nutriente F-12 (DMEM/F12), 5 ml de suplemento exento de suero basado en la formulación N-1 de Bottenstein (suplemento N-2), 5 ml de medio de aminoácidos MEM no esencial, 5 ml de Pen/Estrep, 1 ml de heparina (1 mg/ml)). Se sembraron 20-

25 agrupaciones (de EB) en una placa de 12 pocillos revestida de laminina en 300 µl de medio de diferenciación neural que contiene ácido retinoico (0.1 µM) y proteína homóloga hedgehog de erizo (SHH) (100 ng/ml). El siguiente día se añadieron 2 ml de medio de diferenciación neural y las agrupaciones se cultivaron a 37 °C. En el día 10 se cargó medio de diferenciación neural que contenía ácido retinoico (0,1 µM). en el día 15 se despegaron cuidadosamente rosetas similares al tubo neural de la placa, se transfirieron a un matraz T75 con un nuevo cultivo de células que contenía medio de diferenciación neural y ácido retinoico. Se intercambió el medio en días alternos. En el día 20 las agrupaciones se transfirieron a un tubo de 15 ml y se centrifugaron durante 2 min a 50 g y temperatura ambiente. tras la retirada del medio se incubaron las agrupaciones con 1 ml de Accutase hasta que la suspensión se vio turbia. Tras la adición de 9 ml de medio de diferenciación neural, se aglomeraron las células y las agrupaciones se redujeron de tamaño con un pipeteo cuidadoso. Las agrupaciones más pequeñas se transfirieron a un matraz T75 con un cultivo de células nuevo. Se intercambió el medio en días alternos. En el día 28 se indujo la generación de neuronas motoras espinales sembrando 3-5 esferas en placas revestidas con poli-L-ornitina/laminina en presencia de factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), factor neurotrófico derivado de una línea de células gliales (GDNF), factor 1 de crecimiento análogo a insulina (IGF-1) (10 ng/ml), AMPc (1 µM), ácido ascórbico (200 ng/ml), ácido retinoico (50 nM) y SHH (50 ng/ml). Se intercambió el medio en días alternos hasta el día 56. En el día 35 algunas células se tiñeron para la presencia de HB9. En el día 42 se evaluó la expresión de la colina acetiltransferasa (ChAT). En el día 56 se llevó a cabo la inmunotinción de la sinapsina 2.

Para generar hepatocitos, se usó un protocolo publicado por Moore, R. N. y P. V. Moghe (Stem Cell Res., 2009, 3: 51-62). En resumen, las células iPS se diferenciaron mediante cultivo en placas revestidas con MEF o Matrigel en presencia de varios factores de crecimiento durante un periodo de 2 semanas. Para la diferenciación, las células se hicieron crecer en medio de citoblastos sin FGF2 pero suplementado con dexametasona (10⁻⁷ M), oncostatina M (10 ng/ml), factor de crecimiento de hepatocitos (20 ng/ml), activina A (50 ng/ml) y Wnt 3A (100 ng/ml) durante dos semanas con intercambio diario del medio. Para determinar la extensión de la diferenciación, las células se tiñeron para los marcadores hepatoespecíficos (AFP, albúmina, citoqueratina 18 (CK18), alfa-1-antitripsina (AAT), HNF-4, secuencia A2 forkhead (FOXA2), citocromo inducible P450 1A2 (CYP1A2)) o analizado mediante RT-PCR. se generaron poblaciones puras de hepatocitos mediante la clasificación FACS. Se determinó la funcionalidad de los hepatocitos mediante el análisis de la secreción de albúmina utilizando un ensayo inmunológico de adsorción (ensayo ELISA) así como mediante un ensayo de la etoxiresurofin-O-deetilasa (EROD) para controlar la actividad de CYP1A2 mediante la conversión de la etoxiresorufina a resorufina de acuerdo con el procedimiento descrito en Moore, R. N. y P. V. Moghe (Stem Cell Res., 2009, 3: 51-62).

Para la generación de cardiomiocitos, se usó un protocolo adaptado de Laflamme, M. A. y col. (Nat. Biotechnol., 2007, 25: 1015-1024). Para la inducción de la diferenciación cardíaca, se sembraron en placas células pluripotentes en placas revestidas de Matrigel y se cultivaron en medio RPMI1640 más suplemento B27 (RPMI-B27) que incluía 100 ng/ml de activina A recombinante humana durante 24 h, seguido por 10 ng/ml de proteína 4 morfogénica ósea recombinante (BMP4) durante 4 días. A continuación se cambió el medio a RPMI-B27 sin citoquinas suplementarias durante 2-3 semanas adicionales con intercambio del medio en días alternos. Para determinar el estado de diferenciación de las células, se llevó a cabo el análisis de la RT-PCR de varios genes marcadores mesodérmicos cardíacos (factor de transcripción GATA-4, el gen Nkx2.5, que codifica la proteína homeobox, los genes Tbx5 y Tbx20 que codifican el factor de transcripción de la secuencia T; las quinasas Mlc2a y Mlc2v) de la cadena ligera de la miosina (MLC). Se evaluaron la expresión del factor natriurético auricular (ANF), la cadena 2 ligera de la miosina (Mlc2), la cadena pesada de la miosina (MHC), troponina T, Titina, ANF y la α-actinina sarcomérica mediante la tinción de la inmunofluorescencia. Se aislaron poblaciones puras de cardiomiocitos mediante clasificación FACS.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Paul-Ehrlich-Institut Bundesamt für Sera und Impfstoffe
 SCHNEIDER, Irene
 BUCHHOLZ, Christian
 SCHUMANN, Gerald
 KLAWITTER, Sabine

<120> Novedosas partículas lentivíricas pseudotipadas y su uso en la transducción dirigida *in vitro* de embriocitoblastos humanos pluripotentes indiferenciados y citoblastos pluripotentes inducidos

<130> 141-008P

<150> EP 12000142.5

<151> 11/01/2012

<160> 17

<170> BiSSAP 1.0

<210> 1

<211> 246

<212> PRT

<213> nulo
 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..246
 5 <223> /tipo_mol="proteína"
 /nota="scFV-dirigido contra CD30"
 /organismo=nulo
 <400> 1

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Val | Gln | Leu | Gln | Gln | Ser | Gly | Ala | Glu | Leu | Ala | Arg | Pro | Gly | Ala |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| Ser | Val | Lys | Met | Ser | Cys | Lys | Ala | Ser | Gly | Tyr | Thr | Phe | Thr | Thr | Tyr |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| Thr | Ile | His | Trp | Val | Arg | Gln | Arg | Pro | Gly | His | Asp | Leu | Glu | Trp | Ile |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
| Gly | Tyr | Ile | Asn | Pro | Ser | Ser | Gly | Tyr | Ser | Asp | Tyr | Asn | Gln | Asn | Phe |
| | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | |
| Lys | Gly | Lys | Thr | Thr | Leu | Thr | Ala | Asp | Lys | Ser | Ser | Asn | Thr | Ala | Tyr |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 |
| Met | Gln | Leu | Asn | Ser | Leu | Thr | Ser | Glu | Asp | Ser | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys |
| | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | | 95 |
| Ala | Arg | Arg | Ala | Asp | Tyr | Gly | Asn | Tyr | Glu | Tyr | Thr | Trp | Phe | Ala | Tyr |
| | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | |
| Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Thr | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser |
| | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | | |
| Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Asp | Ile | Glu | Leu | Thr | Gln |
| | 130 | | | | | 135 | | | | | 140 | | | | |
| Ser | Pro | Lys | Phe | Met | Ser | Thr | Ser | Val | Gly | Asp | Arg | Val | Asn | Val | Thr |
| 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 |
| Tyr | Lys | Ala | Ser | Gln | Asn | Val | Gly | Thr | Asn | Val | Ala | Trp | Phe | Gln | Gln |
| | | | | 165 | | | | | 170 | | | | | 175 | |
| Lys | Pro | Gly | Gln | Ser | Pro | Lys | Val | Leu | Ile | Tyr | Ser | Ala | Ser | Tyr | Arg |
| | | | 180 | | | | | 185 | | | | | 190 | | |
| Tyr | Ser | Gly | Val | Pro | Asp | Arg | Phe | Thr | Gly | Ser | Gly | Ser | Gly | Thr | Asp |
| | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | 195 | | | | | 200 | | | | | 205 | | |
| Phe | Thr | Leu | Thr | Ile | Ser | Asn | Val | Gln | Ser | Glu | Asp | Leu | Ala | Glu | Tyr |
| | 210 | | | | | 215 | | | | | 220 | | | | |
| Phe | Cys | Gln | Gln | Tyr | His | Thr | Tyr | Pro | Leu | Thr | Phe | Gly | Gly | Gly | Thr |
| 225 | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 |
| Lys | Leu | Glu | Ile | Lys | Arg | | | | | | | | | | |
| | | | | 245 | | | | | | | | | | | |

10 <210> 2
 <211> 246
 <212> PRT
 <213> nulo

15 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..246
 <223> /tipo_mol="proteína"
 /nota="scFV-dirigido contra CD30opt corregido"
 20 /organismo=nulo

<400> 2

ES 2 717 274 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Asp Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
20 25 30
Thr Ile His Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Ser Asp Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Arg Ala Asp Tyr Gly Asn Tyr Glu Tyr Thr Trp Phe Ala Tyr
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser
115 120 125
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln
130 135 140
Ser Pro Lys Ser Met Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr
145 150 155 160
Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln
165 170 175
Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Val Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg
180 185 190
Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
195 200 205
Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Pro Glu Asp Leu Ala Thr Tyr
210 215 220
Tyr Cys Gln Gln Tyr His Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr
225 230 235 240
Lys Leu Glu Ile Lys Arg
245

<210> 3
<211> 744
<212> ADN
<213> nulo

5

<220>
<221> fuente
<222> 1..744
<223> /tipo_mol="ADN" /nota="-" /scFV-dirigido contra CD30opt corregido="organismo=nulo

10

<400> 3

ES 2 717 274 T3

atggcccagg tgcaactggt gcagtcaggg gctgatgtgg ctagacctgg tgcttcagtg 60
 aagttgtcct gcaaggcttc tggctacacc ttactacct acacaataca ctgggtaaga 120
 cagaggcctg gacagggcct ggaatggatt ggatacatta atcctagcag tggatattct 180
 gactacaatc agaaattcaa gggcaagacc acattgactg cagacaagtc ctccaacaca 240
 gcctacatgc aactgaacag cctgacatct gaggactctg cggcttatta ctgtgcaaga 300
 agagcggact atggtaacta cgaatatacc tggtttgctt actggggcca agggaccacg 360
 gtcaccgtct cctcaagtgg aggcggttca ggtggagggtg gctctggcgg tggcggatcg 420
 gacatcgtga tgactcagtc tccaaaatcc atgtcgacat cagtaggaga cagggtcacc 480
 attacctgca aggccagtca gaatgtgggt actaatgtag cctgggatca acagaaacct 540
 gggcagtctc ctaaacttct gatttactcg gcatcttacc gatacagtgg agtcctgat 600
 cgcttcacag gcagtggatc tggaacagat ttcactctca ccatcagcaa tgtgcagccc 660
 gaggacctgg caacatatta ctgtcaacaa tatcacacct atcctctcac gttcggaggg 720
 ggcaccaagc tggaaatcaa acgg 744

<210> 4
 <211> 1797
 <212> ADN
 <213> nulo

5

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..1797
 <223> /tipo_mol="ADN"
 /nota="Hc-delta-18"
 /organismo=nulo

10

<400> 4

ES 2 717 274 T3

atgggaagta ggatagtcac taacagagaa catcttatga ttgatagacc ttatgttttg 60
 ctggctgttc tgtttgatc gtttctgagc ttgatcgggt tgctagccat tgcaggaatt 120
 cgacttcacg gggcagccat ctacaccgca gagatccata aaagcctcag caccaatcta 180
 gatgtaacta actcaatcga gcatcaggtc aaggacgtgc tgacaccact cttcaaaatc 240
 atcggatgatg aagtgggcct gaggacacct cagagattca ctgacctagt gaaattcacg 300
 tctgacaaga ttaaattcct taatccggat agggagtacg acttcagaga tctcacttgg 360
 tgtatcaacc cgccagagag aatcaaattg gattatgatc aatactgtgc agatgtggct 420
 gctgaagagc tcatgaatgc attggtgaac tcaactctac tggagaccag aacaaccaat 480
 cagttcctag ctgtctcaa gggaaactgc tcagggccca ctacaatcag aggtcaattc 540
 tcaaacatgt cgctgtccct gttagacttg tatttaggtc gaggttacia tgtgtcatct 600
 atagtcacta tgacatccca gggaatgtat gggggaactt acctagtgga aaagcctaata 660
 ctgagcagca aaaggtcaga gttgtcacia ctgagcatgt accgagtgtt tgaagtaggt 720
 gttatcagaa atccgggttt gggggtccg gtgttcata tgacaaacta tcttgagcaa 780
 ccagtcagta atgatctcag caactgtatg gtggctttgg gggagctcaa actcgcagcc 840
 ctttgtcacg ggaagattc tatcacaatt ccctatcagg gatcagggaa aggtgtcagc 900
 ttccagctcg tcaagctagg tgtctggaaa tccccaccg acatgcaatc ctgggtcccc 960
 ttatcaacgg atgatccagt gatagacagg ctttacctct catctcacag aggtgttatc 1020
 gctgacaacc aagcaaatg ggctgtcccg acaacacgaa cagatgacaa gttgcgaatg 1080
 gagacatgct tccaacaggc gtgtaagggt aaaatccaag cactctgca gaatcccag 1140
 tgggcacccat tgaaggataa caggattcct tcatacggg tcttgtctgt tgatctgagt 1200
 ctgacagttg agcttaaaat caaaattgct tcgggattcg ggccattgat cacacacgg 1260
 tcagggatgg acctatacaa atccaaccac aacaatgtgt attggctgac tatcccgcca 1320
 atgaagaacc tagccttagg tgtaatcaac acattggagt ggataccgag attcaaggtt 1380
 agtccctacc tcttactgt cccaattaag gaagcaggcg gagactgcca tgcccaaca 1440
 tacctacctg cggaggtgga tggatgatgc aaactcagtt ccaatctggt gattctacct 1500
 ggtcaagatc tccaatatgt tttggcaacc tacgatactt ccagggttga acatgctgtg 1560
 gtttattacg tttacagccc aagccgctca ttttcttact tttatccttt taggttgctt 1620
 ataaaggggg tccccatcga attacaagtg gaatgcttca catgggacca aaaactctgg 1680
 tgccgtcact tctgtgtgct tgccgactca gaatctggtg gacatatcac tcactctggg 1740
 atggtgggca tgggagtcag ctgcacagtc acccggaag atggaaccaa tcgcaga 1797

<210> 5

ES 2 717 274 T3

<211> 1793
<212> ADN
<213> nulo

5 <220>
<221> fuente
<222> 1. 0,1793
<223> /tipo_mol="ADN"
/nota="Hc-delta-19"
/organismo=nulo

10 <400> 5

```
atgagtagga tagtcattaa cagagaacat cttatgattg atagacctta tgttttgctg      60
gctgttctgt ttgtcatggt tctgagcttg atcgggttgc tagccattgc aggaattcga      120
cttcacggg  cagccatcta caccgcagag atccataaaa gcctcagcac caatctagat      180
gtaactaact caatcgagca tcaggtcaag gacgtgctga caccactctt caaaatcatc      240
```

ES 2 717 274 T3

ggtgatgaag tgggcctgag gacacctcag agattcactg acctagttaa attcatctct 300
 gacaagatta aattccttaa tccggatagg gagtacgact tcagagatct cacttgggtgt 360
 atcaacccgc cagagagaat caaattggat tatgatcaat actgtgcaga tgtggctgct 420
 gaagagctca tgaatgcatt ggtgaactca actctactgg agaccagaac aaccaatcag 480
 ttcctagctg tctcaaaggg aaactgctca gggcccacta caatcagagg tcaattctca 540
 aacatgtcgc tgtccctggt agacttgtat ttaggtcgag gttacaatgt gtcatctata 600
 gtcactatga catcccaggg aatgtatggg ggaacttacc tagtggaata gcctaactctg 660
 agcagcaaaa ggtcagagtt gtcacaactg agcatgtacc gagtgtttga agtaggtgtt 720
 atcagaaatc cgggtttggg ggctccggtg ttccatatga caaactactt gagcaaccag 780
 tcagtaatga tctcagcaac tgtatggtgg ctttggggga gctcaaactc gcagcccttt 840
 gtcacgggga agattctatc acaattccct atcagggatc agggaaagggt gtcagcttcc 900
 agctcgtcaa gctaggtgtc tggaaatccc caaccgacat gcaatcctgg gtccccttat 960
 caacggatga tccagtata gacaggcttt acctctcatc tcacagaggt gttatcgtg 1020
 acaaccaagc aaaatgggct gtcccgacaa cacgaacaga tgacaagttg cgaatggaga 1080
 catgcttcca acaggcgtgt aagggtaaaa tccaagcact ctgcgagaat cccgagtggg 1140
 caccattgaa ggataacagg attccttcat acggggctct gtctgttgat ctgagcttga 1200
 cagttgagct taaaatcaaa attgcttcgg gattcgggcc attgatcaca cacggttcag 1260
 ggatggacct atacaaatcc aaccacaaca atgtgtattg gctgactatc ccgccaatga 1320
 agaacctagc cttaggtgta atcaacacat tggagtggat accgagattc aagggttagtc 1380
 cctacctctt cactgtccca attaaggaag caggcggaga ctgccatgcc ccaacatacc 1440
 tacctgcgga ggtggatggt gatgtcaaac tcagttccaa tctggtgatt ctacctggtc 1500
 aagatctcca atatgttttg gcaacctacg atacttcag ggttgaacat gctgtggttt 1560
 attacgttta cagccaagc cgctcatttt cttactttta tcttttagg ttgcctataa 1620
 agggggtccc catcgaatta caagtggaat gcttcacatg ggaccaaaaa ctctggtgcc 1680
 gtcacttctg tgtgcttgcg gactcagaat ctggtggaca tatcactcac tctgggatgg 1740
 tgggcatggg agtcagctgc acagtcaccc gggaagatgg aaccaatcgc aga 1793

<210> 6
 <211> 1791
 <212> ADN
 <213> nulo

5

<220>
 <221> fuente
 <222> 1. 0,1791
 <223> /tipo_mol="ADN"
 /nota="Hc-delta-24+4A"
 /organismo=nulo

10

<400> 6

ES 2 717 274 T3

atggctgccg cagcgaacag agaacatctt atgattgata gaccttatgt tttgctggct 60
 gttctgtttg tcatgtttct gagcttgatc gggttgctag ccattgcagg aattcgactt 120
 catcgggcag ccatctacac cgcagagatc cataaaagcc tcagcaccaa tctagatgta 180
 actaactcaa tcgagcatca ggtcaaggac gtgctgacac cactcttcaa aatcatcggg 240
 gatgaagtgg gcctgaggac acctcagaga ttcactgacc tagtgaaatt catctctgac 300
 aagattaat tccttaatcc ggatagggag tacgacttca gagatctcac ttggtgtatc 360
 aaccogccag agagaatcaa attggattat gatcaatact gtgcagatgt ggctgctgaa 420
 gagctcatga atgcattggg gaactcaact ctactggaga ccagaacaac caatcagttc 480
 ctagctgtct caaagggaaa ctgctcaggg cccactacaa tcagaggtca attctcaaac 540
 atgtcgctgt ccctgtaga cttgtattta ggtcgaggtt acaatgtgtc atctatagtc 600
 actatgacat cccaggggat gtatggggga acttacctag tggaaaagcc taatctgagc 660
 agcaaaaggt cagagttgtc acaactgagc atgtaccgag tgtttgaagt aggtgttatc 720
 agaaatccgg gtttgggggc tccgggtgtc catatgacaa actatcttga gcaaccagtc 780
 agtaatgatc tcagcaactg tatggtggct ttgggggagc tcaaactcgc agccctttgt 840
 cacggggaag attctatcac aattccctat cagggatcag ggaaaggtgt cagcttccag 900
 ctgctcaagc taggtgtctg gaaatcccca accgacatgc aatcctgggt ccccttatca 960
 acggatgatc cagtgataga caggctttac ctctcatctc acagaggtgt tatcgctgac 1020
 aaccaagcaa aatgggctgt cccgacaaca cgaacagatg acaagttgcg aatggagaca 1080
 tgcttccaac aggcgtgtaa gggtaaaatc caagcactct gcgagaatcc cgagtgggca 1140
 ccattgaagg ataacaggat tccttcatac ggggtcttgt ctggtgatct gagtctgaca 1200
 gttgagctta aaatcaaaat tgcttcggga ttcgggccat tgatcacaca cggttcaggg 1260
 atggacctat acaaatccaa ccacaacaat gtgtattggc tgactatccc gccaatgaag 1320
 aacctagcct taggtgtaat caacacattg gagtggatac cgagattcaa ggttagtccc 1380
 tacctcttca ctgtcccaat taaggaagca ggcggagact gccatgcccc aacataccta 1440
 cctgcgaggg tggatggtga tgtcaaaactc agttccaatc tggtgattct acctggtcaa 1500
 gatctccaat atgttttggc aacctacgat acttccaggg ttgaacatgc tgtggtttat 1560
 tacgtttaca gcccaagccg ctcatthtct tactthtctc thtttaggtt gcctataaag 1620
 ggggtcccca tcgaattaca agtggaatgc ttcacatggg accaaaaact ctggtgccgt 1680
 cacttctgtg tgcttgcgga ctcagaatct ggtggacata tctctctc tgggatggtg 1740
 ggcattgggag tcagctgcac agtcaccccg gaagatggaa ccaatcgag a 1791

<210> 7

ES 2 717 274 T3

<211> 599
 <212> PRT
 <213> nulo

5 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1 ..599
 <223> /tipo_mol="proteína"
 /nota="Hc-delta-18"
 /organismo=nulo

10 <400> 7

```

Met Gly Ser Arg Ile Val Ile Asn Arg Glu His Leu Met Ile Asp Arg
1      5      10      15
Pro Tyr Val Leu Leu Ala Val Leu Phe Val Met Phe Leu Ser Leu Ile
      20      25      30
Gly Leu Leu Ala Ile Ala Gly Ile Arg Leu His Arg Ala Ala Ile Tyr
      35      40      45
Thr Ala Glu Ile His Lys Ser Leu Ser Thr Asn Leu Asp Val Thr Asn
      50      55      60
Ser Ile Glu His Gln Val Lys Asp Val Leu Thr Pro Leu Phe Lys Ile
      65      70      75      80
Ile Gly Asp Glu Val Gly Leu Arg Thr Pro Gln Arg Phe Thr Asp Leu
      85      90      95
Val Lys Phe Ile Ser Asp Lys Ile Lys Phe Leu Asn Pro Asp Arg Glu
      100     105     110
Tyr Asp Phe Arg Asp Leu Thr Trp Cys Ile Asn Pro Pro Glu Arg Ile
      115     120     125
Lys Leu Asp Tyr Asp Gln Tyr Cys Ala Asp Val Ala Ala Glu Glu Leu
      130     135     140
Met Asn Ala Leu Val Asn Ser Thr Leu Leu Glu Thr Arg Thr Thr Asn
145     150     155     160
Gln Phe Leu Ala Val Ser Lys Gly Asn Cys Ser Gly Pro Thr Thr Ile
      165     170     175
Arg Gly Gln Phe Ser Asn Met Ser Leu Ser Leu Leu Asp Leu Tyr Leu
      180     185     190
Gly Arg Gly Tyr Asn Val Ser Ser Ile Val Thr Met Thr Ser Gln Gly
      195     200     205
Met Tyr Gly Gly Thr Tyr Leu Val Glu Lys Pro Asn Leu Ser Ser Lys
      210     215     220
Arg Ser Glu Leu Ser Gln Leu Ser Met Tyr Arg Val Phe Glu Val Gly
225     230     235     240
Val Ile Arg Asn Pro Gly Leu Gly Ala Pro Val Phe His Met Thr Asn
      245     250     255
Tyr Leu Glu Gln Pro Val Ser Asn Asp Leu Ser Asn Cys Met Val Ala
      260     265     270
Leu Gly Glu Leu Lys Leu Ala Ala Leu Cys His Gly Glu Asp Ser Ile
      275     280     285
Thr Ile Pro Tyr Gln Gly Ser Gly Lys Gly Val Ser Phe Gln Leu Val
      290     295     300
Lys Leu Gly Val Trp Lys Ser Pro Thr Asp Met Gln Ser Trp Val Pro
305     310     315     320
Leu Ser Thr Asp Asp Pro Val Ile Asp Arg Leu Tyr Leu Ser Ser His
      325     330     335
Arg Gly Val Ile Ala Asp Asn Gln Ala Lys Trp Ala Val Pro Thr Thr
      340     345     350
Arg Thr Asp Asp Lys Leu Arg Met Glu Thr Cys Phe Gln Gln Ala Cys
      355     360     365
Lys Gly Lys Ile Gln Ala Leu Cys Glu Asn Pro Glu Trp Ala Pro Leu
      370     375     380
Lys Asp Asn Arg Ile Pro Ser Tyr Gly Val Leu Ser Val Asp Leu Ser
    
```

ES 2 717 274 T3

```

385              390              395              400
Leu Thr Val Glu Leu Lys Ile Lys Ile Ala Ser Gly Phe Gly Pro Leu
              405              410
Ile Thr His Gly Ser Gly Met Asp Leu Tyr Lys Ser Asn His Asn Asn
              420              425              430
Val Tyr Trp Leu Thr Ile Pro Pro Met Lys Asn Leu Ala Leu Gly Val
              435              440              445
Ile Asn Thr Leu Glu Trp Ile Pro Arg Phe Lys Val Ser Pro Tyr Leu
              450              455              460
Phe Thr Val Pro Ile Lys Glu Ala Gly Gly Asp Cys His Ala Pro Thr
465              470              475              480
Tyr Leu Pro Ala Glu Val Asp Gly Asp Val Lys Leu Ser Ser Asn Leu
              485              490              495
Val Ile Leu Pro Gly Gln Asp Leu Gln Tyr Val Leu Ala Thr Tyr Asp
              500              505              510
Thr Ser Arg Val Glu His Ala Val Val Tyr Tyr Val Tyr Ser Pro Ser
              515              520              525
Arg Ser Phe Ser Tyr Phe Tyr Pro Phe Arg Leu Pro Ile Lys Gly Val
530              535              540
Pro Ile Glu Leu Gln Val Glu Cys Phe Thr Trp Asp Gln Lys Leu Trp
545              550              555              560
Cys Arg His Phe Cys Val Leu Ala Asp Ser Glu Ser Gly Gly His Ile
              565              570              575
Thr His Ser Gly Met Val Gly Met Gly Val Ser Cys Thr Val Thr Arg
              580              585              590
Glu Asp Gly Thr Asn Arg Arg
              595

```

<210> 8
 <211> 1572
 <212> ADN
 <213> nulo

5

<220>
 <221> fuente
 <222> 1. 0,1572
 <223> /tipo_mol="ADN"
 /note="Fc-delta-30"
 /organismo=nulo

10

<400> 8

ES 2 717 274 T3

atgtccatca tgggtctcaa ggtgaacgtc tctgccatat tcatggcagt actgttaact 60
ctccaaacac ccaccggtca aatccattgg ggcaatctct ctaagatagg ggtggtagga 120
ataggaagtg caagctacaa agttatgact cgttccagcc atcaatcatt agtcataaaa 180
ttaatgcca atataactct cctcaataac tgcacgaggg tagagattgc agaatacagg 240
agactactga gaactgtttt ggaaccaatt agagatgcac ttaatgcaat gaccagaat 300
ataagaccgg ttcagagtgt agcttcaagt aggagacaca agagatttgc gggagtagtc 360
ctggcaggtg cggccctagg cgttgccaca gctgctcaga taacagccgg cattgcactt 420
caccagtcca tgctgaactc tcaagccatc gacaatctga gagcgagcct ggaaactact 480
aatcaggcaa ttgaggcaat cagacaagca gggcaggaga tgatattggc tgttcagggt 540
gtccaagact acatcaataa tgagctgata ccgtctatga accaactatc ttgtgattta 600
atcggccaga agctcgggct caaattgctc agatactata cagaaatcct gtcattattt 660
ggccccagct tacgggacct catatctgcg gagatatcta tccaggcttt gagctatgcg 720
cttggaggag acatcaataa ggtgttagaa aagctcggat acagtggagg tgatttactg 780
ggcatcttag agagcagagg aataaaggcc cggataactc acgtcgacac agagtcctac 840
ttcattgtcc tcagtatagc ctatccgacg ctgtccgaga ttaagggggg gattgtccac 900
cggctagagg gggctctgta caacataggc tctcaagagt ggtataccac tgtgcccaag 960
tatgtcgcaa cccaagggta ccttatctcg aatthttgatg agtcatcgtg tactttcatg 1020
ccagagggaa ctgtgtgcag ccaaaatgcc ttgtaccga tgagtcctct gctccaagaa 1080
tgccctccggg ggtccactaa gtcctgtgct cgtacactcg tatccgggctc ttttgggaac 1140
cggttcattt tatcacaagg gaacctaata gccaatgtg catcaatcct ttgcaagtgt 1200
tacacaacag gaacgatcat taatcaagac cctgacaaga tcctaacata cattgctgcc 1260
gatcactgcc cggtagtcga ggtgaacggc gtgaccatcc aagtcgggag caggaggtat 1320
ccagacgctg tgtacttgca cagaattgac ctcggtcctc ccatatcatt ggagaggttg 1380
gacgtagggg caaatctggg gaatgcaatt gctaagttgg aggatgcaa ggaattgttg 1440
gagtcacgag accagatatt gaggagtatg aaaggtttat cgagcactag catagtctac 1500
atcctgattg cagtgtgtct tggagggttg atagggatcc ccgctttaat atgttgctgc 1560
agggggcggt ga 1572

<210> 9
<211> 522
<212> PRT
<213> nulo

<220>
<221> FUENTE

ES 2 717 274 T3

<222> 1 ..522
 <223> /tipo_mol="proteína"
 /note="Fc-delta-30"
 /organismo=nulo

5 <400> 9

```

Met Ser Ile Met Gly Leu Lys Val Asn Val Ser Ala Ile Phe Met Ala
1          5          10          15
Val Leu Leu Thr Leu Gln Thr Pro Thr Gly Gln Ile His Trp Gly Asn
20          25          30
Leu Ser Lys Ile Gly Trp Gly Ile Gly Ser Ala Ser Tyr Lys Val Met
35          40          45
Thr Arg Ser Ser His Gln Ser Leu Val Ile Lys Leu Met Pro Asn Ile
50          55          60
Thr Leu Leu Asn Asn Cys Thr Arg Val Glu Ile Ala Glu Tyr Arg Arg
65          70          75          80
Leu Leu Arg Thr Val Leu Glu Pro Ile Arg Asp Ala Leu Asn Ala Met
85          90          95
Thr Gln Asn Ile Arg Pro Val Gln Ser Val Ala Ser Ser Arg Arg His
100         105         110
Lys Arg Phe Ala Gly Val Val Leu Ala Gly Ala Ala Leu Gly Val Ala
115        120        125
Thr Ala Ala Gln Ile Thr Ala Gly Ile Ala Leu His Gln Ser Met Leu
  
```


ES 2 717 274 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 130 | | | | | | 135 | | | | | | | | | | 140 |
| Asn | Ser | Gln | Ala | Ile | Asp | Asn | Leu | Arg | Ala | Ser | Leu | Glu | Thr | Thr | Asn | |
| 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 | |
| Gln | Ala | Ile | Glu | Ala | Ile | Arg | Gln | Ala | Gly | Gln | Glu | Met | Ile | Leu | Ala | |
| | | | | 165 | | | | | 170 | | | | | 175 | | |
| Val | Gln | Gly | Val | Gln | Asp | Tyr | Ile | Asn | Asn | Glu | Leu | Ile | Pro | Ser | Met | |
| | | | 180 | | | | | 185 | | | | | 190 | | | |
| Asn | Gln | Leu | Ser | Cys | Asp | Leu | Ile | Gly | Gln | Lys | Leu | Gly | Leu | Lys | Leu | |
| | | 195 | | | | | 200 | | | | | 205 | | | | |
| Leu | Arg | Tyr | Tyr | Thr | Glu | Ile | Leu | Ser | Leu | Phe | Gly | Pro | Ser | Leu | Arg | |
| | 210 | | | | | 215 | | | | | 220 | | | | | |
| Asp | Pro | Ile | Ser | Ala | Glu | Ile | Ser | Ile | Gln | Ala | Leu | Ser | Tyr | Ala | Leu | |
| 225 | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 | |
| Gly | Gly | Asp | Ile | Asn | Lys | Val | Leu | Glu | Lys | Leu | Gly | Tyr | Ser | Gly | Gly | |
| | | | 245 | | | | | | 250 | | | | | 255 | | |
| Asp | Leu | Leu | Gly | Ile | Leu | Glu | Ser | Arg | Gly | Ile | Lys | Ala | Arg | Ile | Thr | |
| | | | 260 | | | | | 265 | | | | | 270 | | | |
| His | Val | Asp | Thr | Glu | Ser | Tyr | Phe | Ile | Val | Leu | Ser | Ile | Ala | Tyr | Pro | |
| | 275 | | | | | | 280 | | | | | 285 | | | | |
| Thr | Leu | Ser | Glu | Ile | Lys | Gly | Val | Ile | Val | His | Arg | Leu | Glu | Gly | Val | |
| | 290 | | | | | 295 | | | | | 300 | | | | | |
| Ser | Tyr | Asn | Ile | Gly | Ser | Gln | Glu | Trp | Tyr | Thr | Thr | Val | Pro | Lys | Tyr | |
| 305 | | | | | 310 | | | | | 315 | | | | | 320 | |
| Val | Ala | Thr | Gln | Gly | Tyr | Leu | Ile | Ser | Asn | Phe | Asp | Glu | Ser | Ser | Cys | |
| | | | | 325 | | | | | 330 | | | | | 335 | | |
| Thr | Phe | Met | Pro | Glu | Gly | Thr | Val | Cys | Ser | Gln | Asn | Ala | Leu | Tyr | Pro | |
| | | | 340 | | | | | 345 | | | | | 350 | | | |
| Met | Ser | Pro | Leu | Leu | Gln | Glu | Cys | Leu | Arg | Gly | Ser | Thr | Lys | Ser | Cys | |
| | | 355 | | | | | 360 | | | | | 365 | | | | |
| Ala | Arg | Thr | Leu | Val | Ser | Gly | Ser | Phe | Gly | Asn | Arg | Phe | Ile | Leu | Ser | |
| | 370 | | | | | 375 | | | | | 380 | | | | | |
| Gln | Gly | Asn | Leu | Ile | Ala | Asn | Cys | Ala | Ser | Ile | Leu | Cys | Lys | Cys | Tyr | |
| 385 | | | | | 390 | | | | | 395 | | | | | 400 | |
| Thr | Thr | Gly | Thr | Ile | Ile | Asn | Gln | Asp | Pro | Asp | Lys | Ile | Leu | Thr | Tyr | |
| | | | | 405 | | | | | 410 | | | | | 415 | | |
| Ile | Ala | Ala | Asp | His | Cys | Pro | Val | Val | Glu | Val | Asn | Gly | Val | Thr | Ile | |
| | | | 420 | | | | | 425 | | | | | 430 | | | |
| Gln | Val | Gly | Ser | Arg | Arg | Tyr | Pro | Asp | Ala | Val | Tyr | Leu | His | Arg | Ile | |
| | | 435 | | | | | 440 | | | | | 445 | | | | |
| Asp | Leu | Gly | Pro | Pro | Ile | Ser | Leu | Glu | Arg | Leu | Asp | Val | Gly | Thr | Asn | |
| | 450 | | | | | 455 | | | | | 460 | | | | | |
| Leu | Gly | Asn | Ala | Ile | Ala | Lys | Leu | Glu | Asp | Ala | Lys | Glu | Leu | Leu | Glu | |
| 465 | | | | | 470 | | | | | 475 | | | | | 480 | |
| Ser | Ser | Asp | Gln | Ile | Leu | Arg | Ser | Met | Lys | Gly | Leu | Ser | Ser | Thr | Ser | |
| | | | | 485 | | | | | 490 | | | | | 495 | | |
| Ile | Val | Tyr | Ile | Leu | Ile | Ala | Val | Cys | Leu | Gly | Gly | Leu | Ile | Gly | Ile | |
| | | | 500 | | | | | 505 | | | | | 510 | | | |
| Pro | Ala | Leu | Ile | Cys | Cys | Cys | Arg | Gly | Arg | | | | | | | |
| | | 515 | | | | | | 520 | | | | | | | | |

<210> 10
 <211> 1791
 <212> ADN
 <213> nulo

5

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..1791
 <223> /tipo_mol="ADN"
 /nota="Hc-delta-24+4A_b"
 /organismo=nulo

10

ES 2 717 274 T3

<400> 10

atggctgccg cagcgaacag agaacatctt atgattgata gaccttatgt ttgctggct 60
gttctgtttg tcatgtttct gagcttgatc gggttgctag ccattgcagg aattcgactt 120
catcgggcag ccatctacac cgagagatc cataaaagcc tcagcaccaa tctagatgta 180
actaactcaa tcgagcatca ggtcaaggac gtgctgacac cactcttcaa aatcatcggg 240
gatgaagtgg gcctgaggac acctcagaga ttactgacc tagtgaaatt catctctgac 300
aagattaaat tccttaatcc ggatagggag tacgacttca gagatctcac ttggtgtatc 360
aaccgccag agagaatcaa attggattat gatcaatact gtgcagatgt ggctgctgaa 420
gagctcatga atgcattggt gaactcaact ctactggaga ccagaacaac caatcagttc 480
ctagctgtct caaagggaaa ctgctcaggg cccactacaa tcagagggtca attctcaaac 540
atgtcgtgtt ccctgttaga cttgtattta ggtcagagggt acaatgtgtc atctatagtc 600
actatgacat ccaggggaat gtatggggga acttacctag tggaaaagcc taatctgagc 660
agcaaaaggt cagagttgtc acaactgagc atgtaccgag tgtttgaagt aggtgttatc 720
agaaatccgg gtttgggggc tccggtgttc catatgacaa actatcttga gcaaccagtc 780
agtaatgatc tcagcaactg tatggtggct ttgggggagc tcaaactcgc agcccttgt 840
cacggggaag attctatcac aattccctat cagggatcag ggaaagggtg cagcttccag 900
ctcgtcaagc taggtgtctg gaaatcccca accgacatgc aatcctgggt ccccttatca 960
acggatgatc cagtgataga caggctttac ctctcatctc acagagggtg tatcgtgac 1020
aaccaagcaa aatgggctgt cccgacaaca cgaacagatg acaagttgcg aatggagaca 1080
tgcttccaac aggcgtgtaa gggtaaaatc caagcactct gcgagaatcc cgagtgggca 1140
ccattgaagg ataacaggat tccttcatac ggggtcttgt ctggtgatct gagtctgaca 1200
gttgagctta aatcaaaaat tgcttcggga ttcgggccat tgatcacaca cggttcaggg 1260
atggacctat acaaatccaa ccacaacaat gtgtattggc tgactatccc gccaatgaag 1320
aacctagcct taggtgtaat caacacattg gagtggatac cgagattcaa ggtagtccc 1380
tacctcttca ctgtcccaat taaggaagca ggcggagact gccatgcccc aacataccta 1440
cctgcggagg tggatggtga tgtcaaaactc agttccaatc tgggtgattct acctggtcaa 1500
gatctccaat atgttttggc aacctacgat acttccaggg ttgaacatgc tgtggtttat 1560
tacgtttaca gccaagccg ctcatcttct tacttttata cttttagggt gcctataaag 1620
ggggtcccca tcgaattaca agtggaatgc ttcacatggg accaaaaact ctggtgccgt 1680
cacttctgtg tgcttgcgga ctcagaatct ggtggacata tcaactcactc tgggatggtg 1740
ggcatgggag tcagctgcac agtcacccgg gaagatggaa ccaatcgag a 1791

ES 2 717 274 T3

<210> 11
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> nulo

5 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..38
 <223> /tipo_mol="proteína"
 /nota="proteína F natural"
 /organismo=nulo

10 <400> 11

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Leu | Ile | Cys | Cys | Cys | Arg | Gly | Arg | Cys | Asn | Lys | Lys | Gly | Glu | Gln | Val |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| Gly | Met | Ser | Arg | Pro | Gly | Leu | Lys | Pro | Asp | Leu | Thr | Gly | Thr | Ser | Lys |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| Ser | Tyr | Val | Arg | Ser | Leu | | | | | | | | | | |
| | | | 35 | | | | | | | | | | | | |

<210> 12
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> nulo

15 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..8
 <223> /tipo_mol="proteína"
 /note="Fc-delta-30"
 /organismo=nulo

20 <400> 12

| | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Leu | Ile | Cys | Cys | Cys | Arg | Gly | Arg |
| 1 | | | | 5 | | | |

25 <210> 13
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> nulo

30 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..38
 <223> /tipo_mol="proteína"
 /nota="proteína H natural"
 /organismo=nulo

35 <400> 13

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Ser | Pro | Gln | Arg | Asp | Arg | Ile | Asn | Ala | Phe | Tyr | Lys | Asp | Asn | Pro |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| His | Pro | Lys | Gly | Ser | Arg | Ile | Val | Ile | Asn | Arg | Glu | His | Leu | Met | Ile |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| Asp | Arg | Pro | Tyr | Val | Leu | | | | | | | | | | |
| | | | 35 | | | | | | | | | | | | |

<210> 14
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> nulo

40 <220>
 <221> FUENTE

ES 2 717 274 T3

<222> 1..20
 <223> /tipo_mol="proteína" /nota="Hc-delta-18" /organismo=nulo

<400> 14

```

Met Gly Ser Arg Ile Val Ile Asn Arg Glu His Leu Met Ile Asp Arg
1          5          10          15
Pro Tyr Val Leu
          20
  
```

5 <210> 15
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> nulo

10 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..19
 <223> /tipo_mol="proteína"
 /nota="Hc-delta-19"
 /organismo=nulo

15 <400> 15

```

Met Ser Arg Ile Val Ile Asn Arg Glu His Leu Met Ile Asp Arg Pro
1          5          10          15
Tyr Val Leu
  
```

20 <210> 16
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> nulo

25 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..18
 <223> /tipo_mol="proteína"
 /nota="Hc-delta-24+4A"
 /organismo=nulo

<400> 16

```

Met Ala Ala Ala Ala Asn Arg Glu His Leu Met Ile Asp Arg Pro Tyr
1          5          10          15
Val Leu
  
```

30 <210> 17
 <211> 248
 <212> PRT
 <213> nulo

35 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..248
 <223> /tipo_mol="proteína"
 /nota="CD30opt"
 /organismo=nulo

<400> 17

ES 2 717 274 T3

Met Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Asp Val Ala Arg Pro
1 5 10 15
Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30
Thr Tyr Thr Ile His Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu
35 40 45
Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Ser Asp Tyr Asn Gln
50 55 60
Lys Phe Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr
65 70 75 80
Ala Tyr Met Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr
85 90 95
Tyr Cys Ala Arg Arg Ala Asp Tyr Gly Asn Tyr Glu Tyr Thr Trp Phe
100 105 110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ser Gly Gly
115 120 125
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met
130 135 140
Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Thr
145 150 155 160
Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala Trp Tyr
165 170 175
Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser
180 185 190
Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly
195 200 205
Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Pro Glu Asp Leu Ala
210 215 220
Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr His Thr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly
225 230 235 240
Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
245

REIVINDICACIONES

1. Uso de partículas de vectores lentivíricos pseudotipados para la transducción dirigida in vitro de embriocitoblastos humanos pluripotentes indiferenciados (hESC) y citoblastos pluripotentes inducidos (iPSC), comprendiendo dicho vector una proteína de fusión de morbilivirus (F) y una proteína hemaglutinina (H) mutada del virus del sarampión (MeV) o la cepa Edmonton del virus del sarampión (MeV_{Edm}), en el que las porciones citoplásmicas de la proteína F y la proteína H están truncadas y la proteína F truncada es FcΔ24 (24 aminoácidos eliminados del extremo C) o FcΔ30 (30 aminoácidos eliminados del extremo C) y la proteína H mutada y la proteína H truncada se selecciona entre el grupo que consiste en HcΔ14 (aminoácidos 2-15 eliminados), HcΔ15 (aminoácidos 2-16 eliminados), HcΔ16 (aminoácidos 2-17 eliminados), HcΔ17 (aminoácidos 2-18 eliminados), HcΔ18 (aminoácidos 2-19 eliminados), HcΔ19 (aminoácidos 2-20 eliminados), HcΔ20 (aminoácidos 2-21 eliminados), HcΔ21+A (aminoácidos 2-22 sustituidos por una alanina) y HcΔ24+4A (aminoácidos 2-25 sustituidos por cuatro alaninas), preferentemente HcΔ18, HcΔ19, y HcΔ24+4A, en el que los aminoácidos necesarios para el reconocimiento del receptor en la proteína H están mutados de manera que no interactúan con CD46, SLAM y/o nectina-4 y en el que la proteína H tiene además un anticuerpo monocatenario dirigido contra CD30, EpCAM (CD326), CD9, Thy-1 (CD90), SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, o TRA-1-81 en su ectodominio.
2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la mutación en la proteína H es:
- al menos una mutación puntual con otro aminoácido en los restos seleccionados entre el grupo que consiste en V451, Y529, Y481, F431, V451, Y452, A527, P486, 1487, A428, L464, R533, G546, S548, y F549 con alanina, leucina, serina, metionina, o glutamina; y/o
 - una mutación puntual de los cinco restos consecutivos 473 a 477 con alanina; y/o
 - al menos una mutación puntual con otro aminoácido en los restos seleccionados entre el grupo que consiste en 1194, D530, Y553, T531, P554, F552, D505 y D507; y/o
 - al menos una mutación puntual con otro aminoácido en los restos seleccionados entre el grupo que consiste en Y543 y P497.
3. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que el scFv se dirige contra CD30 que tiene la secuencia de aminoácidos optimizada que se muestra en la Fig. 5.
4. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la partícula del vector lentivírico pseudotipado se deriva de un lentivirus seleccionado entre el grupo que consiste en VIH-1, VIH-2, VIS_{mac}, VIS_{pbj}, VIS_{agm}, VIF y VAIE, preferentemente VIH-1.
5. El uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la partícula del vector lentivírico pseudotipado no comprende la información genética de los genes *gag*, *env*, y/o *pol* y/o de otros genes no esenciales, que se seleccionan del grupo que consiste en *tat*, *vif*, *vpr*; *vpu*, y *nef*.
6. El uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dichos genes se proporcionan en trans por medio de una línea celular de empaquetamiento, que se selecciona entre el grupo que consiste en células 293 de riñón embrionario humano que contienen el antígeno T grande de SV40 (HEK-293T o 293T), la línea de células FIT-1080 de sarcoma humano (CCL-121), línea de células Raji análogas a linfoblastos (CCL-86), línea de células U87-MG análogas a glioblastoma-astrocitoma epitelial (HTB-14); línea de células HuT78 de linfoma T (TIB-161), más preferentemente HEK-293T.
7. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la cantidad de proteína F truncada presente en dicha partícula de vector es mayor que la cantidad de proteína H mutada y truncada presente en dicha partícula de vector, preferentemente 10-100 %, 100-250 %, 250-500 %, 500-750 %, 750-1000 %, o más de 1000 % mayor y, preferentemente, 700 % mayor que la cantidad de proteína H mutada y truncada.
8. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende además un vector de expresión de ARN psi-positivo, en el que el vector de expresión de ARN psi-positivo comprende al menos un gen marcador seleccionable.
9. El uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el gen marcador seleccionable se selecciona entre el grupo que consiste en un gen que codifica GFP, un gen que codifica eGFP, un gen que codifica una proteína inductora de la apoptosis, un gen que codifica una proteína citotóxica, un gen TNF-α, un gen p53, un ARN interferente, un gen de interferón, el gen de la timidina quinasa del virus del herpes, un gen que codifica una proteína inmunoestimuladora y un gen que codifica una proteína terapéutica.
10. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que los iPSC se seleccionan entre el grupo que consiste en hFFBiPS SB4 y HFFBiPS SB5 o se generan a partir de pacientes que tienen inmunodeficiencia combinada grave relacionada con deficiencia de adenosina-desaminasa, Distrofia muscular de Duchenne (DMD) y Becker (BMD), enfermedad de Parkinson (PD) o diabetes mellitus de tipo 1 de inicio juvenil (JDM).

Fig. 1

scFv-aCD30 ^{V_H 1} QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTF **TTYTIH**
 V DV L

43
WVRQRPGHDLEWIGY **INPSSGYS** DYNQNFKGKTTLTADKSSNTA
 QG K

90
YMQLNLSLTSEDSAVYYCAR **RADYGNYEYTWFA** YWGQGTTTVVSS

^{V_L 1}
GGGGSGGGSGGGGS DIELTQSPKFMSTSVGDRVNVTYK
 VM S TI C

25
ASQNVGTNVA WFQQKPGQSPKVLIIY **SASYRYS** GVPDRFTGSGSG
 Y

87
TDFLTISNVQSEDLAEYFC **QYHTYPLT** FGGGTKLEIKR
 P T Y

Fig. 2

ATGCCCCAGGTGCAACTGGTGCAGTCAGGGGCTGATGTGGCTAGACCTGGTGCTTCA-
GTGAAGTTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTACTACCTACACAATACTGGG-
TAAGACAGAGGCCTGGACAGGGCCTGGAATGGATTGGATACATTAATCCTAGCAGTG-
GATATTCTGACTACAATCAGAAATTCAAGGGCAAGACCACATT-
GACTGCAGACAAGTCCTCCAACACAGCCTACATGCAACTGAACAGCCTGACATCTGAG-
GACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGAAGAGCGGACTATGGTAACTACGAATATAC-
CTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAAGTG-
GAGGCGGTTCAAGGTGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGGACATCGTGATGACT-
CAGTCTCCAAAATCCATGTGCGACATCAGTAGGAGACAGGGTCACCATTAC-
CTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTACTAATGTAGCCTGGTATCAACAGAAAC-
CCGGGCAGTCTCCTAACTTCTGATTTACTCGGCATCTTACCGATACAGTGGAGTCCCT-
GATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGAACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAAT-
GTGCAGCCCCGAGGACCTGGCAACATATTACTGTCAACAATATCACACCTATCCTCTCA-
CGTTCGGAGGGGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGG

Fig. 3A

ATGGGAAGTAGGATAGTCATTAACAGAGAACATCTTATGATTGATAGACCTTATGTTTTGCTGGCTGTTCTGTTTGT
 CATGTTTTCTGAGCTTGATCGGGTTGCTAGCCATTGCAGGAATTCGACTTCATCGGGCAGCCATCTACACCGCAGAGA
 TCCATAAAAGCCTCAGCACC AATCTAGATGTA ACTA ACTCAATCGAGCATCAGGTC AAGGACGTGCTGACACCACTC
 TTCAAAATCATCGGTGATGAAGTGGGCTGAGGACACCTCAGAGATTCAGTACCTAGTGAAATTCATCTCTGACAA
 GATTAATTCCTTAATCCGGATAGGGAGTACGACTTCAGAGATCTCACTTGGTGTATCAACCCGCCAGAGAGAATCA
 AATTGGATTATGATCAACTGTGCAGATGTGGCTGCTGAAGAGCTCATGAATGCATGGTGAAC TCAACTCTACTG
 GAGACCAGAACAACCAATCAGTTCCTAGCTGTCTCAAAGGGAACTGCTCAGGGCCACTACAATCAGAGGTCAATT
 CTCAAAATGTGCTGCTGCCCTGTAGACTTGTATTTAGGTCGAGGTTACAATGTGTATCTATAGTCACTATGACAT
 CCCAGGGAATGTATGGGGAACTTACCTAGTGGAAAAGCCTAATCTGAGCAGCAAAAGGTCAGAGTTGTCACAACCTG
 AGCATGTACCAGTGTTTGAAGTAGGTGTATCAGAAATCCGGGTTGGGGGCTCCGGTGTCCATATGACAAAATA
 TCTTGAGCAACCAGTCAGTAATGATCTCAGCAACTGTATGGTGGCTTTGGGGAGCTCAAAC TCGCAGCCCTTTGTC
 ACGGGGAAGATTCATCACAATCCCTATCAGGGATCAGGGAAGGTCAGCTTCCAGCTCGCAAGCTAGGTGTC
 TGGAAATCCCAACCGACATGCAATCCTGGGTCCCTTATCAACGGATGATCCAGTGATAGACAGGCTTTACCTCTC
 ATCTCACAGAGGTGTATCGCTGACAACCAAGCAAAATGGGCTGTCCCGACAACACGAACAGATGACAAGTTGGCAA
 TGGAGACATGCTTCCAACAGGCGTGAAGGGTAAAATCCAAGCACTCTCGGAGAATCCGAGTGGGCACCAATTGAAG
 GATAACAGGATTCCTTCATACGGGGCTTGTCTGTTGATCTGAGTCTGACAGTTGAGCTTAAAATCAAATTTGCTTC
 GGGATTCCGGCCATTGATCACACCGGTT CAGGGATGGACCTATACAAATCCAACCAACAATGTGTATTTGGCTGA
 CTATCCCGCCAAATGAAGAACCTAGCCCTTAGGTGTAATCAACACATTTGGAGTGGATACCAGATTC AAGGTTAGTCCC
 TACCTCTCTACTGTCCCAATTAAGGAAGCAGGCGGAGACTGCCATGCCCAACATACCTACCTGCGGAGGTGGATGG
 TGATGTCAAAC TCAAGTCCAATCTGGTATTCTACCTGGTCAAGATCTCAAATATGTTTTGGCAACCTACGATACTT
 CCAGGGTTGAACATGCTGTGGTTTATTACGTTTACAGCCCAAGCCGCTCATTTTCTTACTTTTATCCTTTTAGGTTG
 CCTATAAAGGGGGTCCCATCGAATTACAAGTGGAAATGCTTACATGGGACCAAAAACCTCTGGTCCCGTCACTTCTG
 TGTGCTTGGGACTCAGAATCTGGTGGACATATCACTCACTCTGGGATGGTGGGCATGGGAGTCAGCTGCACAGTCA
 CCCGGGAAGATGGAACCAATCGCAGA

Fig. 3B

ATGAGTAGGATAGTCATTAACAGAGAACATCTTATGATTGATAGACCTTATGTTTTGCTGGCTGTTCTGTTTGT
 GTTCTGAGCTTGATCGGGTTGCTAGCCATTGCAGGAATTCGACTTCATCGGGCAGCCATCTACACCGCAGAGATCC
 ATAAAAGCCTCAGCACC AATCTAGATGTA ACTA ACTCAATCGAGCATCAGGTC AAGGACGTGCTGACACCACTCTTC
 AAAATCATCGGTGATGAAGTGGGCTGAGGACACCTCAGAGATTCAGTACCTAGTGAAATTCATCTCTGACAAGAT
 TAAATTCCTTAATCCGGATAGGGAGTACGACTTCAGAGATCTCACTTGGTGTATCAACCCGCCAGAGAGAATCAAAT
 TGATTATGATCAATACTGTGCAGATGTGGCTGCTGAAGAGCTCATGAATGCATTTGGTGAAC TCAACTCTACTGGAG
 ACCAGAACAACCAATCAGTTCCTAGCTGTCTCAAAGGGAACTGCTCAGGGCCCACTACAATCAGAGGTCAATTC
 AAACATGTGCTGTCCCTGTAGACTTGTATTTAGGTCGAGGTTACAATGTGTCATCTATAGTCACTATGACATCCC
 AGGGAATGTATGGGGAACTTACCTAGTGGAAAAGCCTAATCTGAGCAGCAAAAGGTCAGAGTTGTCACAACCTGAGC
 ATGTACCGAGTGTTTGAAGTAGGTGTTATCAGAAATCCGGGTTGGGGGCTCCGGTGTCCATATGACAAAATCTCT
 TGAGCAACCAGTCAGTAATGATCTCAGCAACTGTATGGTGGCTTTGGGGGAGCTCAAAC TCGCAGCCCTTTGTCACG
 GGGAGATTCATCACAATCCCTATCAGGGATCAGGGAAGGTCAGCTTCCAGCTCGTCAAGCTAGGTGCTGCG
 AAATCCCAACCGACATGCAATCCTGGGTCCCTTATCAACGGATGATCCAGTGATAGACAGGCTTTACCTCTCATC
 TCACAGAGGTGTATCGCTGACAACCAAGCAAAATGGGCTGTCCCGACAACACGACAGATGACAAGTTGCGAATGG
 AGACATGCTTCCAACAGGCGTGAAGGGTAAAATCCAAGCACTCTGCGAGAATCCCGAGTGGGCACCAATTGAAGGAT
 AACAGGATTCCTTCATACGGGGCTTGTCTGTTGATCTGAGTCTGACAGTTGAGCTTAAAATCAAATTTGCTTCGGG
 ATTCGGGCCATTGATCACACCGGTT CAGGGATGGACCTATACAAATCCAACCAACAATGTGTATTGGCTGACTA
 TCCCGCCAAATGAAGAACCTAGCTTAGGTGTAATCAACACATTTGGAGTGGATACCGAGATTC AAGGTTAGTCCCTAC
 CTCTTCACTGTCCCAATTAAGGAAGCAGGCGGAGACTGCCATGCCCAACATACCTACCTGCGGAGGTGGATGGTGA
 TGTCAAAC TCAAGTCCAATCTGGTATTCTACCTGGTCAAGATCTCAAATATGTTTTGGCAACCTACGATACTTCCA
 GGGTTGAACATGCTGTGGTTTATTACGTTTACAGCCCAAGCCGCTCATTTTCTTACTTTTATCCTTTTAGGTTGCC
 ATAAAAGGGGTCCTCATCGAATTACAAGTGGAAATGCTTACATGGGACCAAAAACCTCTGGTCCCGTCACTTCTGTGT
 GCTTGGGACTCAGAATCTGGTGGACATATCACTCACTCTGGGATGGTGGGCATGGGAGTCAGCTGCACAGTCAACC
 GGAAGATGGAACCAATCGCAGA

Fig. 3C

ATGGCTGCCGACGGAAACAGAGAACATCTTATGATTGATAGACCTTATGTTTTGCTGGCTGTTCTGTTTGTATGTT
 TCTGAGCTTGATCGGGTGGCTAGCCATTGCAGGAATTCGACTTCATCGGGCAGCCATCTACACCGCAGAGATCCATA
 AAAGCCTCAGCACC AATCTAGATGTAAC TAACTCAATCGAGCATCAGGTCAAGGACCTGCTGACACC ACTCTTCAAA
 ATCATCGGTGATGAAGTGGGCTGAGGACACCTCAGAGATTCACTGACCTAGTGA AATTCATCTCTGACAAGATTAA
 ATTCTTAAATCCGGATAGGGAGTACGACTTCAGAGATCTCACTTGGTGTATCAACCCGCCAGAGAGAATCAAAT TGG
 ATTATGATCAATACTGTGCAGATGTGGCTGCTGAAGAGCTCATGAATGCATTGGTGA ACTCAACTCTACTGGAGACC
 A GAACAACCAATCAGTTCCTAGCTGTCTCAAAGGGAAACTGCTCAGGGCCACTACAATCAGAGGTCAAT TCTCAAA
 CATGTCGCTGTCCCTGTTAGACTTGTATTTAGGTCGAGGTTACAATGTGTCATCTATAGTCACTATGACATCCCAGG
 GAATGTATGGGGAACTTACCTAGTGGAAAAGCCTAATCTGAGCAGCAAAGGTGAGAGTTGTCACA ACTGAGCATG
 TACCGAGTGT TGAAGTAGGTGTATCAGAAATCCGGGTTGGGGGCTCCGGTGTCCATATGACAAACTATCTTGA
 GCAACCAGTCAGTAATGATCTCAGCAACTGTATGGTGGCTTTGGGGGAGCTCAA ACTCGCAGCCCTTTGTCACGGGG
 AAGATTCATCACAATCCCTATCAGGGATCAGGGAAGGTGTCAGCTTCCAGCTCGTCAAGCTAGGTGCTCGGAAA
 TCCCAACCGCATGCAATCCTGGGTCCCTTATCAACGGATGATCCAGTGATAGACAGGCTTTACCTCTCATCTCA
 CAGAGGTGTTATCGCTGACAACCAAGCAAAATGGGCTGTCCCGACAACCGAACAGATGACAAGTTGCGAATGGAGA
 CATGCTTCCAACAGGCGTGAAGGGTAAAAATCCAAGCACTCTGCGAGAATCCCGAGTGGGCACCATTGAAGGATAAC
 AGGATTCCTTATACG GGGTCTTGTCTGTTGATCTGAGCTGACAGTTGAGCTTAAATCAA AATGCTTCGGGATT
 CGGGCCATTGATCACACAGGTTT CAGGGATGGACCTATACAAATCCAACCAACAATGTGTATTGGCTGACTATCC
 CGCAATGAAGAACCTAGCCTTAGGTGTAATCAACACATGGAGTGGATACCGAGATTC AAGGTTAGTCCCTACCTC
 TTCACTGTCCCAATTAAGGAAGCAGGCGGAGACTGCCATGCCCAACATACCTACCTGCGGAGGTGGATGGTGATGT
 CAAACTCAGTTC AATCTGGTGATCTACCTGGTCAAGATCTCCAATATGTTTGGCAACCTACGATACTCCAGGG
 TTGAACATGCTGTGGTTTATTACGTTTACAGCCAAAGCCGCTCA TTTTCTTACTTTTATCCTTTTAGGTTGCCATA
 AAGGGGGTCCCATCGAATTACAAGTGAATGCTTCACATGGGACCAAAA ACTCTGGTGCCGCTACTTCTGTGTGCT
 TGGCGACTCAGAATCTGGTGGACATATCACTCACTCTGGGATGGTGGGCATGGGAGTCAGCTGCACAGTCAACCGGG
 AAGATGGAACCAATCGCAGA

Fig. 3D

MGSRIVINREHLMIDRPYVLLAVLFV MFLSLIGLLAIAGIRLHRAAIYTA EIHKSLSTNLDVNSIEHQVKDVLTP
 FKIIGDEVGLRTPQRF TDLVKFISDKIKFLNPDREYDFRDLTWCINPPERIKLDYDQYCADVA AEELMNALVNSTLL
 ETRTTNQFLAVSKGNCSPPTTIRGQFSNMSLSLLDLYLGRGYNVSSIVTMTSQMGYGGTYLVEKPNLSSKRSELSQL
 SMYRVFEVGVIRNPLGAPV FHTNYLEQPVSNDLSCMV ALGELKLAALCHGEDSITIPYQSGKGVSFQLVKLGV
 WKSPTDMQSWVPLSTDDPVIDR LYLSSH RGV IADNQAKWAVPTTRTDDKLRMETCFQQACKGKIQA L CENPEWAPLK
 DNRIPSYGVLSVDLSLTVELKIKIASGFGLITHSGMDLYKSNHNNVYWLTIPPMKNLALGVINTLEWIPRFKVS P
 YLFTVPIKEAGGDCHAPTYLPAEVDGDV KLSNLVILPGQDLQYV L ATYDTSRVEHVVVVVYVSPSRSFYFPFRL
 PIKGVPIELQVECF TWDQKLWCRHFCVLADSESGGHI THSGMVGMGVSVCTVTREDGTRR

Fig. 3E

ATGTCCATCATGGGTCTCAAGGTGAACGTCTCTGCCATATTCATGGCAGTACTGTTAACTCTCCAAACACCCACCGG
 TCAAATCCATTGGGGCAATCTCTCTAAGATAGGGGTGGTAGGAATAGGAAGTGCAAGCTACAAAGTTATGACTCGTT
 CCAGCCATCAATCATTAGTCATAAAATTAATGCCCAATATAACTCTCCTCAATAACTGCACGAGGGTAGAGATTGCA
 GAATACAGGAGACTACTGAGAACGTTTTGGAACCAATTAGAGATGCACTTAATGCAATGACCCAGAATATAAGACC
 GGTTCAGAGTGTAGCTTCAAGTAGGAGACACAAGAGATTTGCCGGAGTAGTCTGGCAGGTGCGGGCCCTAGGCGTTG
 CCACAGCTGCTCAGATAACAGCCGGCATTGCACTTCACCAAGTCCATGCTGAACTCTCAAGCCATCGACAATCTGAGA
 GCGAGCCTGGAACTACTAATCAGGCAATTGAGGCAATCAGACAAGCAGGGCAGGAGATGATATTGGCTGTTACGGG
 TGTCCAAGACTACATCAATAATGAGCTGATACCGTCTATGAACCAACTATCTTGTGATTTAATCGGCCAGAAGCTCG
 GGCTCAAATTTGCTCAGATACTATACAGAAATCCTGTCAATTTTGGCCCCAGCTTACGGGACCCCATATCTGCGGAG
 ATATCTATCCAGGCTTTGAGCTATGCGCTTGGAGGAGACATCAATAAGGTGTTAGAAAAGCTCGGATACAGTGGAGG
 TGATTTACTGGGCATCTTAGAGAGCAGAGGAATAAAGGCCCGGATAACTCACGTCGACACAGAGTCTTACTTCAATTG
 TCCTCAGTATAGCCTATCCGACGCTGTCCGAGATTAAGGGGGTGATTTGCCACCGGCTAGAGGGGGTCTCGTACAAC
 ATAGGCTCTCAAGAGTGGTATACCACTGTGCCAAGTATGTCGCAACCCCAAGGGTACCTTATCTCGAATTTTGATGA
 GTCATCGTACTTTTATGCCAGAGGGAAGTGTGTGCAGCCAAAATGCCTTGTACCCGATGAGTCTCTGCTCCAAG
 AATGCCTCCGGGGTCCACTAAGTCTGTGCTCGTACACTCGTATCCGGGCTTTTGGGAACCGGTTCAATTTATCA
 CAAGGGAACCTAATAGCCAATTGTGCATCAATCCTTTGCAAGTGTACACAACAGGAACGATCATTAATCAAGACCC
 TGACAAGATCCTAACATACATTGCTGCCGATCACTGCCCGGTAGTCGAGGTGAACGGCGTGACCATCCAAGTCGGGA
 GCAGGAGGTATCCAGACGCTGTGTACTTGCACAGAATTGACCTCGGCTCCCATATCATTGGAGAGGTTGGACGTA
 GGGACAAATCTGGGGAATGCAATTGCTAAGTTGGAGGATGCCAAGGAATGTTGGAGTCATCGGACCAGATATTGAG
 GAGTATGAAAGGTTTATCGAGCACTAGCATAGTCTACATCCTGATTGCAGTGTGCTTGGAGGGTTGATAGGGATCC
 CCGCTTTAATATGTTGCTGCAGGGGCGTTGA

Fig. 3F

MSIMGLKVNVS AIFMAVLLTLQTP TQIHWGNLSKIGVVGIGSASYKVMTRSSHQSLV I K L M P N I T L L N N C T R V E I A
 EYRRLRLT V L E P I R D A L N A M T Q N I R P V Q S V A S S R R H K R F A G V V L A G A A L G V A T A A Q I T A G I A L H Q S M L N S Q A I D N L R
 A S L E T T N Q A I E A I R Q A G Q E M I L A V Q G V Q D Y I N N E L I P S M N Q L S C D L I G Q K L G L K L L R Y Y T E I L S L F G P S L R D P I S A E
 I S I Q A L S Y A L G G D I N K V L E K L G Y S G D L L G I L E S R G I K A R I T H V D T E S Y F I V L S I A Y P T L S E I K G V I V H R L E G V S Y N
 I G S Q E W Y T T V P K Y V A T Q G Y L I S N F D E S S C T F M P E G T V C S Q N A L Y P M S P L L Q E C L R G S T K S C A R T L V S G S F G N R F I L S
 Q G N L I A N C A S I L C K C Y T T G T I I N O D P D K I L T Y I A A D H C P V V E V N G V T I Q V G S R R Y P D A V Y L H R I D L G P P I S L E R L D V
 G T N L G N A I A K L E D A K E L L E S S D Q I L R S M K L S S T S I V Y I L I A V C L G L I G I P A L I C C C R G R

Fig. 3G

ATGGCTGCCGACGGAAACAGAGAACATCTTATGATTGATAGACCTTATGTTTTGCTGGCTGTTCTGTTTGTCTATGTT
TCTGAGCTTGATCGGGTTGCTAGCCATTGCAGGAATTCGACTTCATCGGGCAGCCATCTACACCGCAGAGATCCATA
AAAGCCTCAGCACC AATCTAGATGTAAC TAAC TAATCGAGCATCAGGTC AAGGACGTGCTGACACC ACTCTTCAAA
ATCATCGGTGATGAAGTGGGCTGAGGACACCTCAGAGATTCACTGACCTAGTGAAATTCATCTCTGACAAGATTAA
ATTCCTTAATCCGGATAGGGAGTACGACTTCAGAGATCTCACTTGGTGTATCAACCCGCCAGAGAGAA TCAAATTGG
ATTATGATCAATACTGTGCAGATGTGGCTGCTGAAGAGCTCATGAATGCATTGGTGAAC TCAACTCTACTGGAGACC
AGAACAACCAATCAGTTCCTAGCTGTCTCAAAGGGAAACTGCTCAGGGCCACTACAATCAGAGGTCAATTCTCAAA
CATGTCGCTGTCCCTGTTAGACTTGTATTTAGGTCGAGGTTACAATGTGTCTCTATAGTCACTATGACATCCCAGG
GAATGTATGGGGAACTTACCTAGTGGAAAAGCCTAATCTGAGCAGCAAAAGGTCAGAGTTGTCACAAC TGAACATG
TACCGAGTGTGTTGAAGTAGGTGTTATCAGAAA TCCGGGTTTGGGGGCTCCGGTGTCCATATGACAAA CTATCTTGA
GCAACCAGTCAGTAATGATCTCAGCAACTGTATGGTGGCTTGGGGGAGCTCAAAC TCCGAGCCCTTTGTCACGGGG
AAGATTCATCACAATCCCTATCAGGGATCAGGGAAAGGTGTCAGCTTCCAGCTCGTCAAGCTAGGTGTCTGAAA
TCCCAACCGCATGCAATCCTGGGTCCCTTATCAACGGATGATCCAGTGATAGACAGGCTTTACCTCTCATCTCA
CAGAGGTGTTATCGCTGACAACCAAGCAAAA TGGGCTGTCCCGACAACACGAACAGATGACAAGTTGCGAATGGAGA
CATGCTTCCAACAGGCGTGAAGGGTAAAATCCAAGCACTGCGGAGAA TCCCGAGTGGGCACCATTGAAGGATAAC
AGGATTCCTTCATACGGGGTCTTGTCTGTTGATCTGAGTCTGACAGTTGAGCTTAAAATCAA AATTGCTTCGGGATT
CGGGCCATTGATCACACACGGTTCAGGGATGGACCTATACAAA TCCAACCACAACAATGTGTATTGGCTGACTATCC
CGCCAATGAAGAACCTAGCCTTAGGTGTAATCAACACATTTGGAGTGGATACCGAGATTCAAGGTTAGTCCCTACCTC
TTCACTGTCCCAATTAAGGAAGCAGGCGGAGACTGCCATGCCCAACATACTACCTGCGGAGGTGGA TGGTGATGT
CAAAC TCACTTCCAATCTGGTGA TTTCTACCTGGTCAAGATCTCCAATATGTTTTGGCAACCTACGATACTTCCAGGG
TTGAACATGCTGTGGTTTATTACGTTTACAGCCCAAGCCGCTCATTTTCTACTTTTATCC TTTTAGGTTGCCATA
AAGGGGGTCCCCATCGAATTACAAGTGGAA TGTTCACATGGGACCAAAAAC TCTGGTGCCGTCACTTCTGTGTGCT
TGCGGACTCAGAATCTGGTGGACATATCACTCACTCTGGGATGGTGGGCATGGGAGTCAGCTGCACAGTCA CCGGG
AAGATGGAACCAATCCGAGA

Fig. 4A

| | TM | CD |
|---------------------|-----------|-----------------------------------|
| F _{Edm} wt | LICCC | RGRCNKKGEQVGMSRPGLKPDLTGTSKSYVRSL |
| FcΔ30 | LICCC | RGR |

Fig. 4B

| | CD | TM |
|---------------------|------------------------------------|-----------|
| H _{Edm} wt | MSPQRDRINAFYKDNPHPKGSRIVINREHLMIDR | PYVL |
| HcΔ18 | M.....GSRIVINREHLMIDR | PYVL |
| HcΔ19 | M.....SRIVINREHLMIDR | PYVL |
| HcΔ24+4A | M.....AAAANREHLMIDR | PYVL |

Fig. 5

maqvlvqsgadvarpgasvklscasgyfttyihwvrrpqqglewigyinps-
gysdynqkfkgratltadkssntaymqlnsrsedsavyycarradygnyeytwfa-
ywgqgtvtvsssgggsgggsggggsdivmtqspksmstsvgdrvtitckasqnvgtnva-
wyqqkpgqspklliysasyrysgvpdrftgsgsgtdftltisnvqpedlatyycqyhtyplftgggtkleikr

Fig. 6A

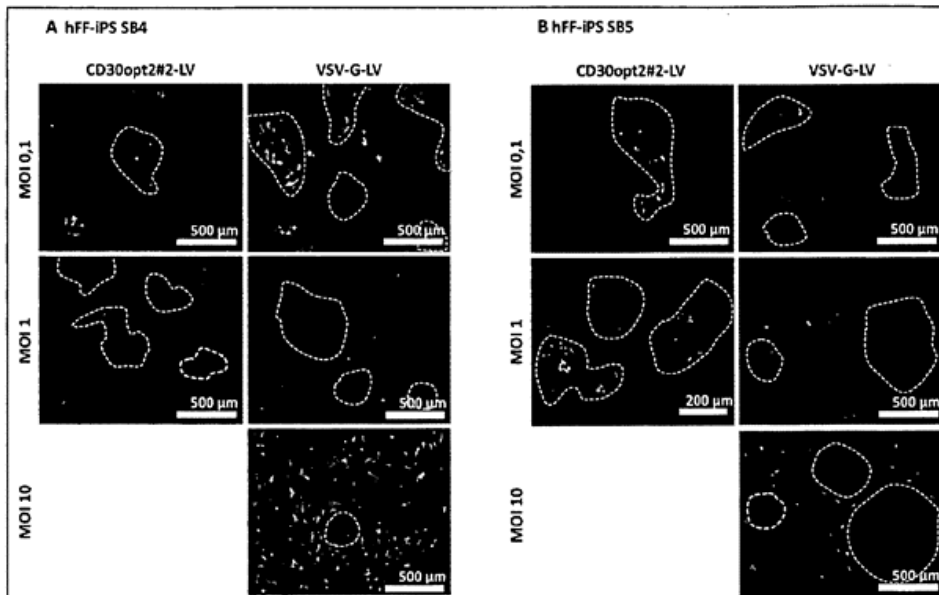


Fig. 6B

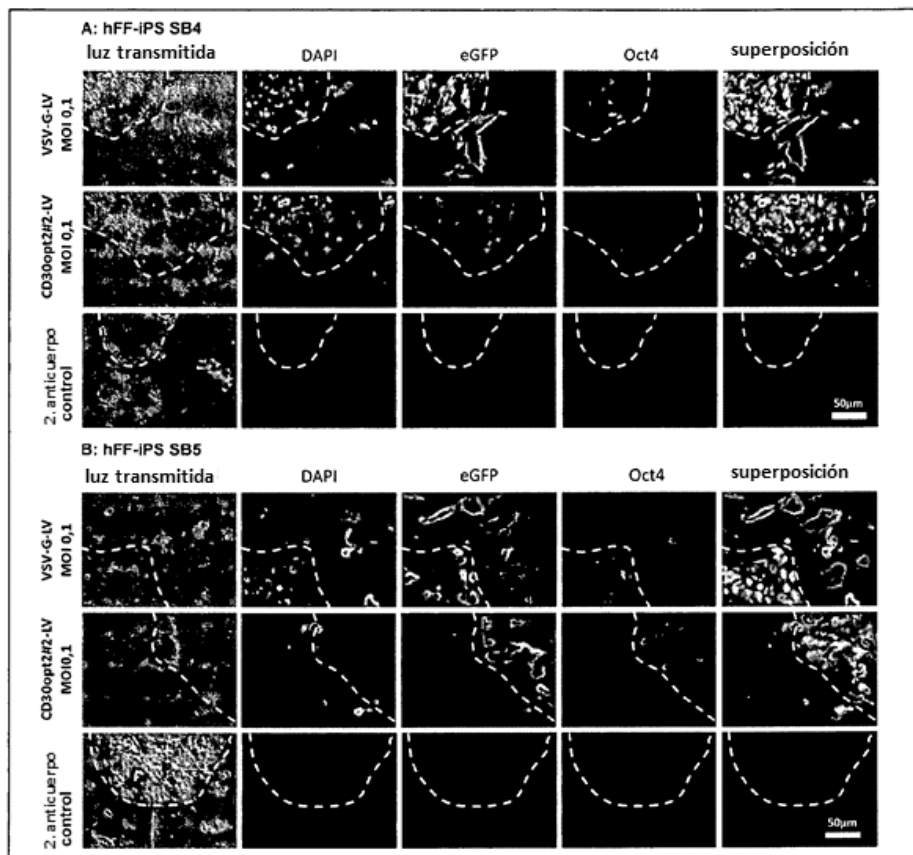


Fig. 7

