

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 744 448**

51 Int. Cl.:

C12N 15/86

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.10.2014** **PCT/EP2014/072852**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.04.2015** **WO15059276**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.10.2014** **E 14792441 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2019** **EP 3060668**

54 Título: **Vectores para la expresión transgénica**

30 Prioridad:

24.10.2013 GB 201318804

24.10.2013 US 201361894994 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
25.02.2020

73 Titular/es:

ADAPTIMMUNE LIMITED (100.0%)

**9400 Garsington Road, Oxford Business Park
Oxford OX2 2HN, GB**

72 Inventor/es:

KAN, ON

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 744 448 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Vectores para la expresión transgénica

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un procedimiento para mejorar la transcripción transgénica usando un sistema de vector que puede comprender una secuencia de nucleótidos espaciadores o de relleno (SNS) en lugar de un elemento regulador postranscripcional. En particular, la presente invención se refiere al reemplazo de una secuencia de elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE) con una secuencia espaciadora corta no relacionada que facilita la expresión eficiente de nucleótidos de interés en un sistema de vectores retrovirales.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los sistemas de vectores retrovirales, tales como los sistemas de vectores lentivirales, se han propuesto como un sistema de entrega. El documento WO98/17815 se refiere a la eliminación de muchos de los genes accesorios. El documento WO99/45126 se refiere a la optimización de codones de la secuencia gag-pol como un medio para tratar de superar el requisito de rev/RRE para la exportación y mejorar la estabilidad del ARN. El elemento regulador postranscripcional (PRE) del virus de la hepatitis B (VHB) y un intrón pueden ser funcionalmente equivalente [Huang, ZM y Yen, TS (1995) Mol. Cell. Biol. 15: 3864-3866]. El virus de la hepatitis de la marmota (WHV), un pariente cercano del VHB, también alberga un PRE (en adelante denominado WPRE; véase el documento US 6.136.597 y US 6.287.814). La inserción del WPRE en vectores lentivirales dio como resultado una mejora significativa de la expresión de genes reporteros tales como luciferasa y proteína verde fluorescente (GFP) en una diversidad de células que abarcan diferentes especies [Zufferey, R. y col, (1999) J. Virol 73: 2886-2892]. La estimulación fue independiente del estado del ciclo de las células transducidas.

El WPRE contiene tres secuencias de acción cis importantes para su función en la mejora de los niveles de expresión. Sin embargo, además, contiene un fragmento de aproximadamente 180 pares de bases (pb), que puede comprender el extremo 5' del marco de lectura abierto de la proteína WHV X, junto con su promotor asociado. La proteína X de longitud completa se ha implicado en la tumorigénesis [Flajolet, M. y col, (1998) J. Virol. 72: 6175-6180]. Esto se ha demostrado directamente [documento US7.419.829] mediante la administración del vector EIAV a ratones fetales en el útero: los ratones transducidos con vectores que contienen el EIAV de tipo silvestre desarrollaron tumores hepáticos, mientras que los ratones transducidos con vectores que carecen de WPRE no desarrollaron tumores hepáticos. Se sabe que la actividad tumorigénica de la activación por cis de los oncogenes de la familia myc debido a la inserción de ADN viral en el genoma del huésped es un mecanismo clave de la carcinogénesis mediada por WHV (Buendia, MA (1994) en C. Brechot (ed.), Primary liver cancer: etiological and progression factors, p. 211-224; CRC Press, Boca Raton, Fla.; Fourel, G. (1994) En F. Tronche y M. Yaniv (ed.), Liver gene expression, p 297-343; RG Landes Company, Austin, Tex.). Además, en el carcinoma hepatocelular humano, la proteína X del virus de la hepatitis B truncada en el terminal C puede ser más oncogénica que la proteína X de longitud completa (TuH y col. 2001 Biological impact of natural COOH-terminal deletions of hepatitis B virus X protein in hepatocellular carcinoma tissues. Cancer Res 61: 7803-7810).

El documento US 7.419.829 implica el reemplazo de la secuencia WPRE de tipo silvestre con una secuencia WPRE mutante diseñada para mantener la expresión transgénica mejorada sin expresión de la proteína X. Se cree que hay un número limitado de cambios que pueden realizarse en el WPRE sin afectar su capacidad para mejorar la expresión transgénica. Sin embargo, se sabe que las transcriptasas inversas retrovirales tienen baja fidelidad (un error único promedio incorporado por cada 10.000 nucleótidos transcritos inversamente). Por lo tanto, existe la posibilidad de que cualquier WPRE mutado revierta a una secuencia funcional de tipo silvestre con potencial tumorigénico.

Real y col (Appl Microbiol Biotechnol

[2011] 91:1581) muestran que la eliminación de WPRE en un vector lentiviral disminuye significativamente la expresión transgénica, al igual que Ramezani y col (Molecular Therapy 2(5):458). Johnson y col (Gene Therapy

[2013] 20:607) demostraron que en un sistema lentiviral donde el transgén ya está optimizado para una alta expresión, la eliminación del WPRE no tiene un efecto significativo en la expresión transgénica: sin embargo, son silenciosos en el reemplazo del WPRE con una secuencia de relleno. El documento EP1757702 describe un sistema de vectores gamma-retrovirales que puede soportar una alta expresión transgénica en ausencia de un WPRE: nuevamente, esto es silencioso al reemplazar el WPRE con una secuencia de relleno.

La cita o identificación de cualquier documento en esta solicitud no es una admisión de que dicho documento esté disponible como técnica anterior a la presente invención.

RESUMEN DE LA INVENCION

Los presentes inventores ahora han demostrado sorprendentemente que el reemplazo del WPRE por una secuencia

de nucleótidos corta no relacionada promueve niveles de expresión mejorados de genes o nucleótidos heterólogos de interés de vectores de expresión retrovirales y lentivirales. Por lo tanto, la eliminación total del ORF de la proteína X elimina el potencial tumorigénico de esta secuencia, aumentando el perfil de seguridad para el uso terapéutico de estos vectores.

Según un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para mejorar la transcripción de al menos un transgén en un vector de expresión lentiviral que comprende introducir una secuencia de nucleótidos de relleno (SNS) insertada en lugar de un elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE) aguas abajo del transgén, donde la expresión del transgén es mayor cuando se inserta la SNS en lugar del WPRE en comparación con el WPRE, y donde la SNS se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, 2, 4, 6 y 7, donde el transgén está bajo el control de un promotor EF1 α , y donde el transgén se expresa en células T

El vector puede derivarse de una especie viral seleccionada del grupo que consiste en virus de inmunodeficiencia humana (VIH), virus de inmunodeficiencia simia (SIV), virus maedi/visna (VMV), virus de artritis encefalitis caprina (CAEV), virus de anemia infecciosa equina (EIAV), virus de inmunodeficiencia felina (FIV) y virus de inmunodeficiencia bovina (BIV).

En consecuencia, es un objeto de la invención no abarcar dentro de la invención ningún producto, procedimiento de fabricación del producto o procedimiento de uso del producto previamente conocido de tal manera que los solicitantes se reserven el derecho y por la presente describan una supresión de cualquier producto previamente conocido, procedimiento o procedimiento. Se observa además que la invención no pretende abarcar dentro del alcance de la invención ningún producto, procedimiento o fabricación del producto o procedimiento de uso del producto, que no cumpla con la descripción escrita y los requisitos de habilitación de la USPTO (35 USC §112, primer párrafo) o la EPO (artículo 83 de la EPC), de tal manera que los solicitantes se reserven el derecho y por la presente describan una supresión de cualquier producto descrito anteriormente, procedimiento de fabricación del producto o procedimiento de uso del producto.

Se observa que en esta descripción y particularmente en las reivindicaciones y/o párrafos, términos tales como "comprende", "comprendido", "que comprende" y similares pueden tener el significado que se le atribuye en la ley de patentes de los EE.UU.; por ejemplo, pueden significar "incluye", "incluido", "que incluye" y similares; y que términos tales como "que consiste esencialmente en" y "consiste esencialmente en" tienen el significado que se les atribuye en la ley de patentes de los EE. UU., por ejemplo, permiten elementos que no se enumeran explícitamente, pero excluyen elementos que se encuentran en la técnica anterior o que afectan una característica básica o novedosa de la invención.

Estas y otras realizaciones se describen o son obvias y están abarcadas por la siguiente descripción detallada.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La siguiente descripción detallada, dada a modo de ejemplo, pero no destinada a limitar la invención únicamente a las realizaciones específicas descritas, puede entenderse mejor junto con los dibujos adjuntos.

La figura 1 es un mapa esquemático del plásmido de transferencia original designado pELNS-NY-ESO ADB152.

La figura 2 es un mapa esquemático del plásmido designado pELNS-NY-ESO NoX ADB693. Se ha realizado una modificación en la región WPRE del plásmido pELNS-NY-ESO ADB152 para eliminar el promotor X y la proteína X truncada en el extremo 3'.

La figura 3 es un mapa esquemático del plásmido designado pELNS-NY-ESO NoW ADB694. Se ha realizado una modificación en la región WPRE del plásmido pELNS-NY-ESO ADB152 para reemplazar la región WPRE con 6 nucleótidos (TCTAGA), es decir, un sitio de enzima de restricción XbaI.

La figura 4 es un mapa esquemático del plásmido designado pELNS Tomato-Luc ADB73

La figura 5 es un mapa esquemático del plásmido designado pELNS Luc ADB678.

La figura 6 es un mapa esquemático del plásmido designado pELNS LucNoX ADB679.

La figura 7 es un mapa esquemático del plásmido designado pELNS LucNoW ADB680.

La figura 8 es un gráfico que muestra los niveles de proteínas de la cápside gag p24 asociadas al vector lentiviral presentes en las preparaciones de vectores lentivirales Luc, LucNoX y LucNoW.

La figura 9 es un gráfico que muestra la expresión de actividades de luciferasa en células SupT1 transducidas con diluciones en serie de vectores Luc, LucNoX y LucNoW.

La figura 10 es un gráfico que muestra la expresión de actividades de luciferasa en SupT1 y células T primarias de cuatro donantes diferentes designados Buff504, Buff505, Buff506 y Buff507.

La figura 11 es un gráfico que muestra las actividades de luciferasa expresadas por las células SupT1 transducidas con LV derivadas de plásmidos transgénicos que expresan luciferasa que contienen secuencias de relleno de reemplazo de WPRE o WPRE de longitud completa.

La figura 12 muestra la expresión del NYESO-1 TCR en la superficie de las células SupT1 transducidas con diluciones en serie de NY-ESO1, NY-ESO1 WPRE NoX o NY-ESO1 NoW 6mer.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Ahora se describirán diversas características y realizaciones preferidas de la presente invención a modo de ejemplos no limitantes. Aunque en general, las técnicas mencionadas en esta invención son bien conocidas en la técnica, se puede hacer referencia en particular a Sambrook, y col., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (1989) y Ausubel y col., *Short Protocols in Molecular Biology* (1999) 4.^a Ed., John Wiley & Sons, Inc. (así como la versión completa de *Current Protocols in Molecular Biology*).

Como se usa en esta invención, la expresión "operativamente unido" significa que los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar de la manera prevista.

El elemento regulador postranscripcional (WPRE) del virus de la hepatitis de la marmota (WHV) puede mejorar la expresión de varios tipos de vectores diferentes, incluidos los vectores lentivirales [documentos US 6.136.597; 6.287.814; Zufferey, R. y col. (1999) *J. Virol.* 73: 2886-92]. Sin querer limitarse a la teoría, se cree que esta mejora se debe a un procesamiento de ARN mejorado a nivel postranscripcional, lo que resulta en un aumento de los niveles de transcripciones nucleares. Un aumento de dos veces en la estabilidad del ARNm también contribuye a esta mejora [Zufferey, R., y col. *ibid*]. Se ha informado que el nivel de mejora de la expresión de proteínas de las transcripciones que contienen WPRE frente a las que no tienen WPRE es de alrededor de 2 a 5 veces, y se correlaciona bien con el aumento en los niveles de transcripción. Esto se ha demostrado con varios transgenes diferentes (Zufferey, R., y col. *ibid*).

El WPRE contiene tres secuencias de acción cis importantes para su función en la mejora de los niveles de expresión. Además, contiene un fragmento de aproximadamente 180 pb que puede comprender el extremo 5' del ORF de la proteína WHV X (el ORF de longitud completa es de 425 pb), junto con su promotor asociado. La traducción de transcripciones iniciadas a partir del promotor X da como resultado la formación de una proteína que representa los 60 aminoácidos NH₂-terminales de la proteína X. Esta proteína X truncada puede promover la tumorigénesis, particularmente si la secuencia de la proteína X truncada está integrada en el genoma de la célula huésped en loci específicos [Balsano, C. y col. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 176: 985-92; Flajolet, M. y col. (1998) *J. Virol.* 72: 6175-80; Zheng, YW y col., (1994) *J. Biol. Chem.* 269: 22593-8; Runkel, L., y col. (1993) *Virology* 197: 529-36]. Además, la proteína X truncada en el terminal C puede ser más oncogénica que la proteína X de longitud completa (Tu H y col. 2001 *Cancer Res* 61: 7803-7810). Por lo tanto, la expresión de la proteína X truncada podría promover la tumorigénesis si se suministra a las células de interés, lo que impide el uso seguro de las secuencias WPRE de tipo silvestre.

Como se usa en esta invención, la "región X" del WPRE se define como que tiene al menos los primeros 60 aminoácidos del ORF de la proteína X, incluido el codón de iniciación de la traducción, y su promotor asociado. Una proteína X "funcional" se define en esta invención como una proteína X truncada que es capaz de promover la tumorigénesis, o un fenotipo transformado, cuando se expresa en células de interés. Una proteína X "no funcional" en el contexto de esta solicitud se define como una proteína X que es incapaz de promover la tumorigénesis en las células de interés.

El presente inventor ha reemplazado la secuencia WPRE con una secuencia de nucleótidos espaciadores o de relleno (SNS) y descubrió que todavía se produce una transcripción eficiente: por lo tanto, se evita la posibilidad de tumorigénesis mediada por el ORF de la proteína X. La secuencia de nucleótidos espaciadores o de relleno (SNS) puede ser cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 2, 4, 6 y 7. El relleno también contiene sitios de enzimas de restricción para enzimas de restricción que se cortan con poca frecuencia (es decir, que es poco probable que estén presentes en el ácido nucleico que se analiza) y no están presentes en la región de clonación múltiple del vector de biblioteca para permitir la eliminación de múltiples secuencias de relleno.

Por lo tanto, la descripción proporciona un procedimiento para mejorar la transcripción de al menos un transgén en un vector lentiviral que comprende una secuencia de nucleótidos de relleno (SNS) insertadas aguas abajo del transgén en lugar de un WPRE.

Se conoce el concepto de usar vectores virales para la terapia génica (Verma y Somia (1997) *Nature* 389:239-242).

Los lentivirus pertenecen a la familia de los retrovirus, pero pueden infectar tanto a las células en división como a las que no lo hacen [Lewis y col (1992) *EMBO J.* 3053-3058].

El grupo de lentivirus se puede dividir en "primate" y "no primate". Los ejemplos de lentivirus de primates incluyen el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el agente causante del síndrome de inmunodeficiencia humana adquirida (SIDA) y el virus de la inmunodeficiencia simia (SIV). El grupo lentiviral no de primates incluye el prototipo de "virus lento" virus maedi/visna (VMV), así como el virus de encefalitis artritis caprina relacionada (CAEV), el virus de anemia infecciosa equina (EIAV) y el virus de inmunodeficiencia felina descrito más recientemente (FIV) y el virus de inmunodeficiencia bovina (BIV).

Los detalles sobre la estructura genómica de algunos lentivirus se pueden encontrar en la técnica. A modo de ejemplo, los detalles sobre el VIH y el EIAV se pueden encontrar en la base de datos de NCBI Genbank (es decir, los números de acceso al genoma AF033819 y AF033820, respectivamente). Los detalles de las variantes del VIH también se

pueden encontrar en las bases de datos del VIH mantenidas por el Laboratorio Nacional de Los Álamos. Los detalles de los clones de EIAV se pueden encontrar en la base de datos NCBI mantenida por los Institutos Nacionales de Salud. Véase también las patentes de los EE.UU. n.º 7.790.419; 7.585.676; 7.419.829; 7.351.585; 7.303.910; 7.198.784; 7.070.994; 6.924.123; 6.818.209; 6.808.922; 6.800.281; 6.783.981; 6.541.248; 6.312.683; y 6.312.682.

Durante el procedimiento de infección, un retrovirus se une inicialmente a un receptor específico de la superficie celular. Al entrar en la célula huésped susceptible, el genoma de ARN retroviral se copia a continuación al ADN mediante la transcriptasa inversa codificada por virus, que se transporta dentro del virus original. Este ADN se transporta al núcleo de la célula huésped donde posteriormente se integra en el genoma del huésped. En esta etapa, típicamente esto se conoce como provirus. El provirus es estable en el cromosoma del huésped durante la división celular y se transcribe como otros genes celulares. El provirus codifica las proteínas y otros factores necesarios para producir más virus, que pueden abandonar la célula mediante un procedimiento a veces llamado "gemación".

Cada genoma retroviral puede comprender genes llamados gag, pol y env, que codifican proteínas y enzimas de virión. Estos genes están flanqueados en ambos extremos por regiones llamadas repeticiones terminales largas (LTR). Las LTR son responsables de la integración proviral y la transcripción. También sirven como secuencias potenciadoras-promotoras. En otras palabras, las LTR pueden controlar la expresión de los genes virales. La encapsidación de los ARN retrovirales se produce en virtud de una secuencia psi ubicada en el extremo 5' del genoma viral.

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

Para el genoma viral, el sitio de inicio de la transcripción está en el límite entre U3 y R en el lado izquierdo LTR y el sitio de adición de poli (A) (terminación) está en el límite entre R y U5 en el lado derecho LTR. U3 contiene la mayoría de los elementos de control de la transcripción del provirus, que incluyen las secuencias promotoras y potenciadoras múltiples que responden a las proteínas activadoras de la transcripción celular y, en algunos casos, viral. Algunos retrovirus tienen uno o más de los siguientes genes que codifican proteínas que están involucradas en la regulación de la expresión génica: tat, rev, tax y rex.

Con respecto a los genes estructurales gag, pol y env mismos; gag codifica la proteína estructural interna del virus. La proteína gag se procesa proteolíticamente en las proteínas maduras MA (matriz), CA (cápside) y NC (nucleocápside). El gen pol codifica la transcriptasa inversa (RT), que contiene ADN polimerasa, RNasa H e integrasa (IN) asociadas, que median la replicación del genoma. El gen env codifica la glucoproteína de superficie (SU) y la proteína transmembrana (TM) del virión, que forman un complejo que interactúa específicamente con las proteínas del receptor celular. Esta interacción conduce finalmente a la infección por fusión de la membrana viral con la membrana celular.

Los retrovirus también pueden contener genes "adicionales", que codifican proteínas distintas de gag, pol y env. Los ejemplos de genes adicionales incluyen en el VIH, uno o más de vif, vpr, vpx, vpu, tat, rev y nef. EIAV tiene, por ejemplo, los genes adicionales S2 y dUTPase.

Las proteínas codificadas por genes adicionales cumplen diversas funciones, algunas de las cuales pueden ser duplicadoras de una función proporcionada por una proteína celular. En EIAV, por ejemplo, tat actúa como un activador transcripcional de la LTR viral. Se une a una estructura secundaria estable de ARN de tallo-lazo denominada TAR. Rev regula y coordina la expresión de genes virales a través de elementos de respuesta de rev (RRE). Se cree que los mecanismos de acción de estas dos proteínas son muy similares a los mecanismos análogos en los virus de los primates. La función de S2 es desconocida. Además, se ha identificado una proteína EIAV, Ttm, que está codificada por el primer exón de tat empalmado a la secuencia de codificación env al comienzo de la proteína transmembrana.

Se han propuesto sistemas de vectores retrovirales como un sistema de entrega para, entre otras cosas, la transferencia de un NOI a uno o más sitios de interés. La transferencia puede ocurrir in vitro, ex vivo, in vivo o combinaciones de los mismos.

Una partícula de vector retroviral recombinante es capaz de transducir una célula receptora con un NOI. Una vez dentro de la célula, el genoma de ARN de la partícula del vector se transcribe inversamente en el ADN y se integra en el ADN de la célula receptora.

Como se usa en esta invención, la expresión "genoma de vector" se refiere a la construcción de ARN presente en la partícula de vector retroviral y/o la construcción de ADN integrada. La expresión también abarca una construcción de ADN separada o aislada capaz de codificar dicho genoma de ARN. Un genoma retroviral o lentiviral puede comprender al menos una parte componente derivable de un retrovirus o un lentivirus. El término "derivable" se usa en su sentido normal en el sentido de una secuencia de nucleótidos o una parte de la misma, que no necesariamente debe obtenerse de un virus tal como un lentivirus, sino que podría derivarse de ella. A modo de ejemplo, la secuencia puede prepararse sintéticamente o mediante el uso de técnicas de ADN recombinante. Preferentemente, el genoma puede comprender una región psi (o un componente análogo que sea capaz de causar encapsidación).

El genoma del vector viral es preferentemente "defectuoso en la replicación", donde el genoma no comprende suficiente información genética sola para permitir la replicación independiente para producir partículas virales infecciosas dentro de la célula receptora. El genoma puede carecer de un gen funcional env, gag o pol.

El genoma del vector viral puede comprender algunas o todas las repeticiones terminales largas (LTR). Preferentemente, el genoma puede comprender al menos parte de las LTR o una secuencia análoga, que sea capaz de mediar la integración proviral y la transcripción. La secuencia también puede comprender o actuar como una secuencia potenciadora-promotora.

El genoma del vector viral puede proporcionarse como un kit de partes. Por ejemplo, el kit puede comprender (i) un plásmido o plásmidos que contienen los NOI y secuencias reguladoras internas, tales como, por ejemplo, un promotor o una secuencia o secuencias de IRES; y (ii) una construcción del genoma retroviral con sitios de reconocimiento de enzimas de restricción adecuados para clonar los NOI y las secuencias reguladoras internas en el genoma viral.

Se sabe que la expresión separada de los componentes requeridos para producir una partícula de vector retroviral en secuencias de ADN separadas cointroducidas en la misma célula producirá partículas retrovirales que portan genomas retrovirales defectuosos que portan genes terapéuticos (por ejemplo, revisado por Miller 1992). Esta célula se conoce como la célula productora (véase más abajo).

Hay dos procedimientos comunes para generar células productoras. En uno, las secuencias que codifican las proteínas retrovirales gag, pol y env se introducen en la célula y se integran de manera estable en el genoma celular; se produce una línea celular estable que se denomina línea celular de empaquetamiento. La línea celular de empaquetamiento produce las proteínas requeridas para empaquetar ARN retroviral, pero no puede provocar la encapsidación debido a la falta de una región psi. Sin embargo, cuando se introduce un genoma de vector que tiene una región psi en la línea celular de empaquetamiento, las proteínas auxiliares pueden empaquetar el ARN del vector recombinante psi positivo para producir la reserva de virus recombinante. Esto puede usarse para transducir el NOI a las células receptoras. El virus recombinante cuyo genoma carece de todos los genes necesarios para producir proteínas virales puede infectar solo una vez y no puede propagarse. Por lo tanto, el NOI se introduce en el genoma de la célula huésped sin la generación de retrovirus potencialmente dañinos. Se presenta un resumen de las líneas de empaquetamiento disponibles en "Retrovirus" (1997 Cold Spring Harbor Laboratory Press Eds: JM Coffin, SM Hughes, HE Varmus págs. 449).

La presente descripción también proporciona una línea celular de empaquetamiento que puede comprender un genoma de vector viral de la presente invención. Por ejemplo, la línea celular de empaquetamiento puede transducirse con un sistema de vector viral que puede comprender el genoma o transfectarse con un plásmido que porta una construcción de ADN capaz de codificar el genoma de ARN. La presente descripción también proporciona una partícula de vector retroviral (o lentiviral) producida por dicha célula.

La segunda estrategia consiste en introducir las tres secuencias de ADN diferentes que se requieren para producir una partícula de vector retroviral, es decir, las secuencias de codificación env, la secuencia de codificación gag-pol y el genoma retroviral defectuoso que contiene uno o más NOI en la célula al mismo tiempo por transfección transitoria y el procedimiento se denomina transfección triple transitoria [Landau y Littman (1992) J Virol 66:8 5110-5113; Pear y col (1993) Proc natl Acad Sci USA 90:18 8392-6]. El procedimiento de triple transfección se ha optimizado [Soneoka y col. Nucleic Acids Res (1995) 23:4 628-633; Finer y col (1994) Blood 83:43-50]. El documento WO 94/29438 describe la producción de células productoras in vitro utilizando este procedimiento de transfección transitoria de ADN múltiple.

Los componentes del sistema viral, que se requieren para complementar el genoma del vector, pueden estar presentes en uno o más "plásmidos productores" para transfectar a las células.

La presente descripción también proporciona un procedimiento de reducción de la tumorigenicidad asociada con un vector retroviral que comprende un WPRE que contiene una región X, comprendiendo el procedimiento reemplazar el WPRE que contiene una región X con una secuencia de nucleótidos espaciadora o de relleno (SNS).

El SNS es como se define en esta invención.

El reemplazo del WPRE que contiene la región X con un SNS sorprendentemente da como resultado la reducción del efecto de tumorigenicidad del vector cuando se transfecta en células, pero conserva la alta fidelidad de replicación y la replicación transgénica mejorada eficientemente. Por lo tanto, el perfil de seguridad de dicho vector retroviral se incrementa sobre el de un vector que contiene las secuencias de la región WPRE/X.

La presente descripción también proporciona un sistema de vectores para producir una partícula derivada de retrovirus, que puede comprender (i) un genoma retroviral según el segundo aspecto de la invención; (ii) una secuencia de nucleótidos que codifica proteínas gag y pol retrovirales; (iii) secuencias de nucleótidos que codifican otros componentes esenciales de empaquetamiento viral no codificados por la secuencia de nucleótidos de (ii).

Preferentemente, la(s) secuencia(s) de ácido nucleico que codifica(n) al menos uno de vpr, vif, tat, nef o genes auxiliares análogos, del retrovirus del que derivan las partículas, se interrumpe tal como dicha(s) secuencia(s) de ácido nucleico son incapaces de codificar vpr, vif, tat, nef funcionales o proteínas auxiliares análogas, o se eliminan del sistema.

5 La presente descripción también proporciona una célula transfectada con dicho sistema de vector y una partícula de vector retroviral producida por dicha célula. Preferentemente, la secuencia gag-pol es un codón optimizado para su uso en la célula productora particular (véase más abajo).

10 La proteína env codificada por la secuencia de nucleótidos de iii) puede ser una proteína env retroviral o lentiviral homóloga. Como alternativa, puede ser un env heterólogo o un env de un no retro o lentivirus (véase más abajo en "pseudotipado").

15 La expresión "sistema de vector viral" se usa generalmente para referirse a un kit de partes que se pueden usar cuando se combinan con otros componentes necesarios para la producción de partículas virales para producir partículas virales en las células huésped. Por ejemplo, el genoma del vector retroviral puede carecer de uno o más de los genes necesarios para la replicación viral. Esto se puede combinar en un kit con una secuencia o secuencias de nucleótidos complementarias adicionales, por ejemplo, en uno o más plásmidos productores. Por cotransfección del genoma junto con el(los) plásmido(s) productor(es), se deben proporcionar los componentes necesarios para la producción de partículas virales infecciosas.

Como alternativa, la(s) secuencia(s) de nucleótidos complementaria(s) puede(n) estar presente(s) de manera estable dentro de una línea celular de empaquetamiento que se incluye en el kit.

25 La presente descripción también se refiere a un sistema de vector retroviral, que es capaz de suministrar un genoma de ARN a una célula receptora, donde el genoma es más largo que el genoma de tipo silvestre del lentivirus. El sistema de vector puede, por ejemplo, ser un sistema de vector EIAV.

30 Preferentemente, el genoma de ARN del sistema del vector tiene hasta 5 %, más preferentemente hasta 10 % o incluso hasta 30 % más bases que el genoma de tipo silvestre. Preferentemente, el genoma de ARN es aproximadamente un 10 % más largo que el genoma de tipo silvestre. Por ejemplo, el EIAV de tipo silvestre puede comprender un genoma de ARN de aproximadamente 8 kb. Un sistema de vector EIAV de la presente invención puede tener un genoma de ARN de hasta (preferentemente aproximadamente) 8,8 kb.

35 Preferentemente, el sistema de vector retroviral de la presente descripción es un sistema de vector autoinactivador (SIN).

40 A modo de ejemplo, se han construido sistemas de vectores retrovirales autoinactivadores eliminando los potenciadores transcripcionales o los potenciadores y promotores en la región U3 de la LTR 3'. Después de una ronda de transcripción inversa e integración de vectores, estos cambios se copian en las LTR 5' y 3', produciendo un provirus transcripcionalmente inactivo. Sin embargo, cualquier promotor(es) interno(s) a las LTR en dichos vectores seguirá siendo transcripcionalmente activo. Esta estrategia se ha empleado para eliminar los efectos de los potenciadores y promotores en las LTR virales en la transcripción de genes colocados internamente. Dichos efectos incluyen una mayor transcripción o supresión de la transcripción. Esta estrategia también se puede utilizar para eliminar la transcripción aguas abajo del 3' LTR en el ADN genómico. Esto es de particular interés en la terapia génica humana donde puede ser importante evitar la activación accidental de un oncogén endógeno (Yu y col., (1986) PNAS 83: 3194-98; Naviaux y col., (1996) J. Virol. 70: 5701-5; Iwakuma y col., (1999) Virol. 261: 120-32).

50 Preferentemente, se usa un mecanismo asistido por recombinasa, que facilita la producción de vectores lentivirales regulados de alto título a partir de las células productoras de la presente invención.

Como se usa en esta invención, la expresión "sistema asistido por recombinasa" incluye, pero no se limita a, un sistema que usa los sitios de reconocimiento de recombinasa Cre/loxP del bacteriófago PI o la recombinasa FLP específica de sitio de *S. cerevisiae*, que cataliza eventos de recombinación entre objetivos de reconocimiento FLP (FRT) de 34 pb.

55 La recombinasa FLP específica de sitio de *S. cerevisiae*, que cataliza eventos de recombinación entre objetivos de reconocimiento FLP (FRT) de 34 pb, se ha configurado en construcciones de ADN para generar líneas celulares productoras de alto nivel utilizando eventos de recombinación asistida por recombinasa (Karremann y col (1996) NAR 24:1616-1624). Se ha desarrollado un sistema similar utilizando los sitios de reconocimiento Cre recombinasa/loxP del bacteriófago PI (Vanin y col (1997) J. Virol 71:7820-7826). Esto se configuró en un genoma lentiviral de modo que se generaron líneas celulares productoras de lentivirales de alto título.

65 Mediante el uso de líneas celulares productoras/de empaquetamiento, es posible propagar y aislar cantidades de partículas de vectores retrovirales (por ejemplo, para preparar títulos adecuados de las partículas de vectores retrovirales) para la transducción posterior de, por ejemplo, un sitio de interés (tal como tejido cerebral adulto). Las líneas celulares productoras suelen ser mejores para la producción a gran escala o partículas de vectores.

La transfección transitoria tiene numerosas ventajas sobre el procedimiento de la célula de empaquetamiento. A este respecto, la transfección transitoria evita el tiempo más largo requerido para generar líneas celulares productoras de vectores estables y se usa si el genoma del vector o los componentes de empaquetamiento retroviral son tóxicos para las células. Si el genoma del vector codifica genes tóxicos o genes que interfieren con la replicación de la célula huésped, tales como los inhibidores del ciclo celular o los genes que inducen la apoptosis, pueden ser difícil generar líneas celulares productoras de vectores estables, pero la transfección transitoria puede ser utilizada para producir el vector antes de que las células mueran. Además, las líneas celulares se han desarrollado utilizando infecciones transitorias que producen niveles de títulos de vectores que son mejores que los niveles obtenidos de líneas celulares productoras de vectores estables (Pear y col 1993, PNAS 90:8392-8396).

Las células productoras/células de empaquetamiento pueden ser de cualquier tipo de célula adecuada. Las células productoras son generalmente células de mamífero, pero pueden ser, por ejemplo, células de insecto.

Como se usa en esta invención, la expresión "célula productora" o "célula productora de vectores" se refiere a una célula que contiene todos los elementos necesarios para la producción de partículas de vectores retrovirales.

Preferentemente, la célula productora se puede obtener de una línea de células productoras estable.

Preferentemente, la célula productora se puede obtener de una línea de células productoras estable derivada.

Preferentemente, la célula productora se puede obtener de una línea de células productoras derivada.

Como se usa en esta invención, la expresión "línea de células productoras derivada" es una línea de células productoras transducida que se ha cribado y seleccionado para una alta expresión de un gen marcador. Dichas líneas celulares apoyan la expresión de alto nivel del genoma retroviral. La expresión "línea de células productoras derivada" se usa indistintamente con la expresión "línea de células productoras estable derivada" y la expresión "línea de células productoras estable".

Preferentemente, la línea de células productoras derivada incluye, pero no se limita a, una célula productora retroviral y/o lentiviral.

Preferentemente, la línea de células productoras derivada es una línea de células productoras de VIH o EIAV, más preferentemente una línea de células productoras de EIAV.

Preferentemente, las secuencias de proteínas de la envoltura y las secuencias de nucleocápsides están todas integradas de manera estable en la célula productora y/o de empaquetamiento. Sin embargo, una o más de estas secuencias también podrían existir en forma episomal y la expresión génica podría producirse desde el episoma.

Como se usa en esta invención, la expresión "célula de empaquetamiento" se refiere a una célula que contiene los elementos necesarios para la producción de virus recombinantes infecciosos que faltan en el genoma de ARN. Típicamente, dichas células de empaquetamiento contienen uno o más plásmidos productores, que son capaces de expresar proteínas estructurales virales (tales como gag-pol y env optimizadas por codón) pero no contienen una señal de empaquetamiento.

La expresión "señal de empaquetamiento" que se denomina indistintamente como "secuencia de empaquetamiento" o "psi" se usa en referencia a la secuencia de acción cis no codificante requerida para la encapsidación de cadenas de ARN retrovirales durante la formación de partículas virales. En el VIH-1, esta secuencia se ha mapeado a loci que se extiende aguas arriba del sitio donante de empalme principal (SD) a al menos el codón de inicio de gag.

Las líneas celulares de empaquetamiento adecuadas para su uso con las construcciones de vectores descritas anteriormente pueden prepararse fácilmente (véase también el documento WO 92/05266), y se utilizan para crear líneas celulares productoras para la producción de partículas de vectores retrovirales. Como ya se mencionó, se presenta un resumen de las líneas de empaquetamiento disponibles en "Retrovirus" (como arriba).

También como se analizó anteriormente, se ha descubierto que las líneas celulares de empaquetamiento simples, que pueden comprender un provirus donde se ha eliminado la señal de empaquetamiento, conducen a la producción rápida de virus competentes de replicación indeseables mediante recombinación. Con el fin de mejorar la seguridad, se han producido líneas celulares de segunda generación, donde se elimina la LTR 3' del provirus. En dichas células, serían necesarias dos recombinaciones para producir un virus de tipo silvestre. Una mejora adicional implica la introducción de los genes gag-pol y el gen env en construcciones separadas, llamadas líneas celulares de empaquetamiento de tercera generación. Estas construcciones se introducen secuencialmente para evitar la recombinación durante la transfección.

Preferentemente, las líneas celulares de empaquetamiento son líneas celulares de empaquetamiento de segunda generación.

Preferentemente, las líneas celulares de empaquetamiento son líneas celulares de empaquetamiento de tercera generación.

5 En estas líneas celulares de tercera generación de construcción dividida, se puede lograr una reducción adicional en la recombinación cambiando los codones. Esta técnica, basada en la redundancia del código genético, tiene como objetivo reducir la homología entre las construcciones separadas, por ejemplo, entre las regiones de solapamiento en los marcos de lectura abiertos gag-pol y env.

10 Las líneas celulares de empaquetamiento son útiles para proporcionar los productos génicos necesarios para encapsular y proporcionar una proteína de membrana para una producción de partículas de vector de alto título. La célula de empaquetamiento puede ser una célula cultivada in vitro, tal como una línea celular de cultivo de tejidos. Las líneas celulares adecuadas incluyen, pero no se limitan a, células de mamífero, tales como líneas celulares derivadas de fibroblastos murinos o líneas celulares humanas. Preferentemente, la línea celular de empaquetamiento es una
15 línea celular de primates o humanos, tal como, por ejemplo: HEK293, 293-T, TE671, HT1080.

Es altamente deseable usar preparaciones de virus de alto título tanto en aplicaciones experimentales como prácticas. Las técnicas para aumentar el título viral incluyen el uso de una señal de empaquetamiento psi adicional como se analizó anteriormente y la concentración de reservas virales.

20 Como se usa en esta invención, la expresión "título alto" significa una cantidad efectiva de un vector o partícula retroviral que es capaz de transducir un sitio objetivo tal como una célula.

25 Como se usa en esta invención, la expresión "cantidad efectiva" significa una cantidad de un vector retroviral o lentiviral o una partícula de vector que es suficiente para inducir la expresión de los NOI en un sitio objetivo.

Una preparación viral de alto título para una célula productora/de empaquetamiento suele ser del orden de 10^5 a 10^7 partículas de retrovirus por ml. Para la transducción en tejidos tal como el cerebro, es necesario usar volúmenes muy pequeños, por lo que la preparación viral se concentra por ultracentrifugación. La preparación resultante debe tener al
30 menos 10^8 ut/ml, preferentemente de 10^8 a 10^9 ut/ml, más preferentemente al menos 10^9 ut/ml. (El título se expresa en unidades de transducción por ml (ut/ml) como se titula en una línea celular D17 estándar). Se pueden usar otros procedimientos de concentración tales como ultrafiltración o unión y elución de una matriz.

35 Los productos de expresión codificados por los NOI pueden ser proteínas secretadas por la célula. Como alternativa, los productos de expresión de NOI no se secretan y son activos dentro de la célula. Para algunas aplicaciones, se prefiere que el producto de expresión NOI demuestre un efecto espectador o un efecto espectador distante; es decir, la producción del producto de expresión en una célula que conduce a la modulación de células adicionales relacionadas, ya sean vecinas o distantes (por ejemplo, metastásicas), que poseen un fenotipo común.

40 La presencia de una secuencia denominada tracto central de polipurina (cPPT) puede mejorar la eficiencia del suministro de genes a las células que no se dividen. [Charneau y Clavel (1991) J Virol 65:2415-2421; Barry y col (2001) Human Gene Therapy 12:1103-1108] Este elemento de acción cis se encuentra, por ejemplo, en el elemento de la región codificante de la polimerasa EIAV. Preferentemente, el genoma de la presente descripción puede comprender una secuencia de cPPT.

45 Además, el genoma viral puede comprender un potenciador traduccional.

Los NOI pueden estar unidos operativamente a uno o más elementos promotores/potenciadores. La transcripción de uno o más NOI puede estar bajo el control de LTR virales o, como alternativa, elementos promotores-potenciadores.
50 Preferentemente, el promotor es un promotor viral fuerte tal como CMV, o es un promotor constitutivo celular tal como PGK, beta-actina o EF1 alfa. El promotor puede ser regulado o específico de tejido. El control de la expresión también se puede lograr mediante el uso de sistemas tales como el sistema de tetraciclina que activa o desactiva la expresión génica en respuesta a agentes externos (en este caso, la tetraciclina o sus análogos).

55 En el diseño de sistemas de vectores retrovirales, es deseable diseñar partículas con diferentes especificidades de células objetivo para el virus nativo, para permitir el suministro de material genético a un intervalo expandido o alterado de tipos de células. Una manera de lograr esto es mediante la ingeniería de la proteína de la envoltura del virus para alterar su especificidad. Otra estrategia es introducir una proteína de envoltura heteróloga en la partícula del vector para reemplazar o añadir a la proteína de envoltura nativa del virus.

60 El término pseudotipado significa incorporar en al menos una parte de, o sustituir una parte de, o reemplazar todo, un gen env de un genoma viral con un gen env heterólogo, por ejemplo, un gen env de otro virus. El pseudotipado no es un fenómeno nuevo y se pueden encontrar ejemplos en los documentos WO 99/61639, WO 98/05759, WO 98/05754, WO 97/17457, WO 96/09400, WO 91/00047 y Mebatsion y col (1997) Cell 90, 841-847.

65 En una descripción preferida, el sistema de vector está pseudotipado con un gen que codifica al menos parte de la

proteína G de la rabia. Se pueden encontrar ejemplos de vectores retrovirales pseudotipados de rabia G en el documento WO 99/61639. El sistema del vector puede ser pseudotipado con un gen que codifica al menos parte de la proteína VSV-G. Se pueden encontrar ejemplos de vectores retrovirales pseudotipados VSV-G en el documento US 5.817.491.

Se ha demostrado que se puede construir un sistema mínimo de retrovirus o lentivirus a partir de los virus VIH, SIV, FIV y EIAV. Dicho sistema no requiere ninguno de los genes adicionales vif, vpr, vpx, vpu, tat, rev y nef para la producción de vectores o para la transducción de células en división y no división. También se ha demostrado que se puede construir un sistema de vector mínimo EIAV que no requiere S2 para la producción del vector o para la transducción de células en división y no división. La eliminación de genes adicionales es muy ventajosa. En primer lugar, permite que se produzcan vectores sin los genes asociados con la enfermedad en infecciones lentivirales (por ejemplo, VIH). En particular, tat está asociado con la enfermedad.

En segundo lugar, la eliminación de genes adicionales permite que el vector empaquete más ARN heterólogo. En tercer lugar, los genes cuya función es desconocida, tal como S2, pueden omitirse, reduciendo así el riesgo de causar efectos no deseados. Los ejemplos de vectores lentivirales mínimos se describen en el documento WO 99/32646 y en el documento WO 98/17815.

La ausencia de genes auxiliares funcionales del sistema de producción de vectores retrovirales significa que esos genes funcionales también estarán ausentes de las partículas del vector retroviral producidas por el sistema. Además, cualquier proteína auxiliar que de otro modo sería codificada por esos genes e incorporada a las partículas del vector estará ausente de las partículas del vector. En los sistemas de producción de vectores retrovirales conocidos, los genes auxiliares pueden estar presentes como parte del ADN que codifica el genoma del vector, o junto con los componentes de empaquetamiento. La ubicación de un gen auxiliar en un sistema de producción de vectores depende en parte de su relación con otros componentes retrovirales. Por ejemplo, vif es a menudo parte de un casete de empaquetamiento de gag-pol en una célula de empaquetamiento. Por lo tanto, eliminar un gen auxiliar funcional para los objetivos de la invención puede involucrar su eliminación de los componentes de empaquetamiento, o del genoma del vector, o quizás de ambos.

Eliminar un gen auxiliar funcional puede no requerir la eliminación del gen en su totalidad. Por lo general, la eliminación de parte del gen o la interrupción del gen de alguna otra manera será suficiente. La ausencia de un gen auxiliar funcional se entiende en esta invención que significa que el gen no está presente en una forma donde sea capaz de codificar la proteína auxiliar funcional.

En un sistema preferido, los genes funcionales vpr y tat o genes análogos normalmente presentes en el lentivirus donde se basan las partículas del vector están ausentes. Estos dos genes auxiliares están asociados con características de los lentivirus que son particularmente indeseables para un vector de terapia génica. Sin embargo, aparte de la condición dada anteriormente, la invención no está limitada con respecto a la combinación de genes auxiliares que están ausentes en un sistema según la invención para producir partículas de vector basadas en VIH-1, cualquier combinación de tres o más preferentemente cuatro, de los genes pueden estar ausentes en su forma funcional. Más preferentemente, los cinco genes auxiliares vpr, vif, tat, nef y vpu están ausentes en su forma funcional. Del mismo modo, para sistemas relacionados con otros lentivirus, lo más preferente es que todos los genes auxiliares estén ausentes en su forma funcional (excepto rev que preferentemente está presente a menos que se reemplace por un sistema análogo al sistema rev/RRE).

Por lo tanto, preferentemente, el sistema de suministro utilizado carece al menos de tat y S2 (si se trata de un sistema de vector EIAV), y posiblemente también vif, vpr, vpx, vpu y nef. Más preferentemente, los sistemas también carecen de rev. Anteriormente se pensaba que rev era esencial en algunos genomas retrovirales para la producción eficiente de virus. Por ejemplo, en el caso del VIH, se pensó que deberían incluirse las secuencias rev y RRE. Sin embargo, se ha descubierto que el requisito de rev y RRE puede reducirse o eliminarse mediante la optimización del codón (véase más abajo) o mediante el reemplazo con otros sistemas equivalentes funcionales tales como el sistema MPMV. Como la expresión del gag-pol optimizado con codón es independiente de rev, RRE puede eliminarse del casete de expresión de gag-pol, eliminando así cualquier potencial de recombinación con cualquier RRE contenido en el genoma del vector.

En una descripción preferida, el genoma viral carece del elemento de respuesta rev (RRE). En otra descripción preferida, una secuencia de ácido nucleico que codifica rev, o un equivalente funcional de la misma, se interrumpe de tal manera que la secuencia de ácido nucleico sea incapaz de codificar la rev funcional o se elimine del genoma del vector.

En una descripción preferida, el sistema utilizado se basa en un denominado sistema "mínimo" donde se han eliminado algunos o todos los genes adicionales. Preferentemente, el vector viral tiene un genoma viral mínimo.

Como se usa en esta invención, la expresión "genoma viral mínimo" significa que el vector viral ha sido manipulado para eliminar los elementos no esenciales y conservar los elementos esenciales para proporcionar la funcionalidad requerida para infectar, transducir y suministrar un NOI a una célula huésped objetivo.

Preferentemente, el vector viral con el genoma viral mínimo es un vector lentiviral mínimo.

La optimización de codones se ha descrito previamente en el documento WO99/41397. Las diferentes células difieren en su uso de codones particulares. Este sesgo de codón corresponde a un sesgo en la abundancia relativa de tRNA particulares en el tipo de célula. Al alterar los codones en la secuencia para que coincidan con la abundancia relativa de los ARNt correspondientes, es posible aumentar la expresión. Del mismo modo, es posible disminuir la expresión eligiendo deliberadamente codones para los cuales se sabe que los tRNA correspondientes son raros en el tipo de célula particular. Por lo tanto, hay disponible un grado adicional de control traslacional.

Muchos virus, incluido el VIH y otros lentivirus, usan una gran cantidad de codones raros y al cambiarlos para que se correspondan con los codones de mamíferos comúnmente utilizados, se puede lograr una mayor expresión de los componentes de empaquetamiento en las células productoras de mamíferos. Las tablas de uso de codones son conocidas en la técnica para células de mamíferos, así como para una diversidad de otros organismos.

La optimización de codones tiene otras ventajas. En virtud de las alteraciones en sus secuencias, las secuencias de nucleótidos que codifican los componentes de empaquetamiento de las partículas virales requeridas para el ensamblaje de partículas virales en las células productoras/células de empaquetamiento tienen secuencias de inestabilidad de ARN (INS) eliminadas de ellas. Al mismo tiempo, la secuencia de codificación de la secuencia de aminoácidos para los componentes de empaquetamiento se conserva de modo que los componentes virales codificados por las secuencias permanecen iguales, o al menos lo suficientemente similares como para que la función de los componentes de empaquetamiento no se vea comprometida. La optimización de codones también supera el requisito de rev/RRE para la exportación, lo que hace que las secuencias optimizadas sean independientes de rev. La optimización de codones también reduce la recombinación homóloga entre diferentes construcciones dentro del sistema de vectores (por ejemplo, entre las regiones de solapamiento en los marcos de lectura abiertos gag-pol y env). El efecto general de la optimización del codón es, por lo tanto, un aumento notable en el título viral y una seguridad mejorada.

Solo los codones relacionados con el INS pueden ser codones optimizados. Sin embargo, mucho más preferido y práctico, las secuencias pueden ser codón optimizadas en su totalidad, con la excepción de la secuencia que abarca el sitio de desplazamiento de marcos.

El gen gag-pol tiene dos marcos de lectura solapados que codifican las proteínas gag y pol respectivamente. La expresión de ambas proteínas depende de un desplazamiento de marco durante la traducción. Este desplazamiento de marco se produce como resultado del "deslizamiento" del ribosoma durante la traducción. Se cree que este deslizamiento es causado, al menos en parte, por estructuras secundarias de ARN que bloquean los ribosomas. Dichas estructuras secundarias existen aguas abajo del sitio de desplazamiento de marcos en el gen gag-pol. Para el VIH, la región de solapamiento se extiende desde el nucleótido 1222 aguas abajo del comienzo de gag (donde el nucleótido 1 es la A del gag ATG) hasta el final de gag (nt 1503). En consecuencia, un fragmento de 281 pb que abarca el sitio de desplazamiento de marcos y la región solapada de los dos marcos de lectura preferentemente no está optimizado por codones. La retención de este fragmento permitirá una expresión más eficiente de las proteínas gag-pol.

Para EIAV, el comienzo del solapamiento se ha tomado como nt 1262 (donde el nucleótido 1 es la A del gag ATG). El final del solapamiento es de 1461 pb. Para garantizar que se conservan el sitio de desplazamiento de marco y el solapamiento de gag-pol, la secuencia de tipo silvestre se ha conservado desde nt 1156 a 1465.

Se pueden hacer derivaciones del uso óptimo del codón, por ejemplo, para acomodar sitios de restricción convenientes, y se pueden introducir cambios conservadores de aminoácidos en las proteínas gag-pol.

La optimización de codones puede basarse en genes de mamíferos altamente expresados. La tercera y, a veces, la segunda y tercera base pueden cambiarse.

Debido a la naturaleza degenerada del código genético, se apreciará que un trabajador cualificado puede lograr numerosas secuencias de gag-pol. Además, se describen muchas variantes retrovirales que pueden usarse como punto de partida para generar una secuencia gag-pol optimizada con codón. Los genomas lentivirales pueden ser bastante variables. Por ejemplo, hay muchas cuasiespecies de VIH-1 que aún son funcionales. Este es también el caso de EIAV. Estas variantes pueden usarse para mejorar partes particulares del procedimiento de transducción. Los detalles de las variantes del VIH también se pueden encontrar en las bases de datos del VIH mantenidas por el Laboratorio Nacional de Los Álamos. Los detalles de los clones de EIAV se pueden encontrar en la base de datos NCBI mantenida por los Institutos Nacionales de Salud.

La estrategia para secuencias de gag-pol optimizadas con codón puede usarse en relación con cualquier retrovirus. Esto se aplicaría a todos los lentivirus, incluidos EIAV, FIV, BIV, CAEV, VMR, SIV, HIV-1 y HIV-2. Además, este procedimiento podría usarse para aumentar la expresión de genes de HTLV-1, HTLV-2, HFV, HSRV y retrovirus endógenos humanos (HERV), MLV y otros retrovirus.

La optimización de codones puede hacer que la expresión gag-pol sea independiente de rev. Sin embargo, para permitir el uso de factores anti-rev o RRE en el vector retroviral, sería necesario hacer que el sistema de generación de vectores virales sea totalmente independiente de rev/RRE. Por lo tanto, el genoma también necesita ser modificado. Esto se logra optimizando los componentes del genoma del vector. Ventajosamente, estas modificaciones también pueden conducir a la producción de un sistema más seguro ausente de todas las proteínas adicionales tanto en el productor como en la célula transducida.

Como se describió anteriormente, los componentes de empaquetamiento para un vector retroviral incluyen productos de expresión de genes gag, pol y env. Además, el empaquetamiento eficiente depende de una secuencia corta de 4 lazos de tallos seguidos de una secuencia parcial de gag y env (la "señal de empaquetamiento"). Por lo tanto, la inclusión de una secuencia gag eliminada en el genoma del vector retroviral (además de la secuencia gag completa en la construcción de empaquetamiento) optimizará el título del vector. Hasta la fecha, se ha informado que el empaquetamiento eficiente requiere de 255 a 360 nucleótidos de gag en vectores que aún conservan secuencias env, o aproximadamente 40 nucleótidos de gag en una combinación particular de mutación de donantes de empalme, gag y deleciones de env. Sorprendentemente, se ha descubierto que la eliminación de todos excepto los 360 nucleótidos N-terminales más o menos en gag conduce a un aumento en el título del vector. Por lo tanto, preferentemente, el genoma del vector retroviral incluye una secuencia gag que puede comprender una o más deleciones, más preferentemente la secuencia gag que puede comprender aproximadamente 360 nucleótidos que derivan del extremo N.

El término NOI (secuencia de nucleótidos de interés) incluye cualquier secuencia de nucleótidos adecuada, que no es necesariamente una secuencia completa de ADN o ARN natural. Por lo tanto, el NOI puede ser, por ejemplo, una secuencia de ARN/ADN sintética, una secuencia de ARN/ADN optimizada por codón, una secuencia de ARN/ADN recombinante (es decir, preparada mediante el uso de técnicas de ADN recombinante), una secuencia de ADNc o una secuencia de ADN genómico parcial, incluidas sus combinaciones. La secuencia no necesita ser una región de codificación. Si es una región de codificación, no necesita ser una región de codificación completa. Además, la secuencia de ARN/ADN puede estar en una orientación sentido o en una orientación antisentido. Preferentemente, está en una orientación de sentido. Preferentemente, la secuencia es, puede comprender o se transcribe a partir de ADNc.

Los NOI, también conocidos como "secuencia(s) heteróloga(s)", "gen(es) heterólogo(s)" o "transgen(es)", pueden ser uno o más de, por ejemplo, un gen(es) de selección, gen(es) marcador(es) y gen(es) terapéutico(s).

El NOI puede ser un gen candidato que es de importancia potencial en un procedimiento de enfermedad. Por lo tanto, el sistema de vectores de la presente invención puede, por ejemplo, usarse para fines de validación de objetivos.

El NOI puede tener una aplicación terapéutica o diagnóstica. Los NOI adecuados incluyen, pero no se limitan a: secuencias que codifican enzimas, citocinas, quimiocinas, hormonas, anticuerpos, moléculas antioxidantes, moléculas similares a inmunoglobulinas modificadas por ingeniería, un anticuerpo de cadena sencilla, proteínas de fusión, moléculas inmunoestimuladoras, moléculas inmunomoduladoras, ARN antisentido, ARN interferente pequeño (siRNA), un mutante transdominante negativo de una proteína objetivo, una toxina, una toxina condicional, un antígeno, una proteína supresora de tumores y factores de crecimiento, proteínas de membrana, proteínas pro y antiangiogénicas y péptidos, proteínas y péptidos vasoactivos, proteínas antivirales y ribozimas, y derivados de los mismos (tal como con un grupo reportero asociado). Los NOI también pueden codificar enzimas activadoras de profármacos. Cuando se usa en un contexto de investigación, los NOI también pueden codificar genes reporteros tales como, pero no se limitan a, proteína verde fluorescente (GFP), luciferasa, beta-galactosidasa, o genes de resistencia a antibióticos, tales como, por ejemplo, ampicilina, neomicina, zeocina, cloramfenicol, higromicina, kanamicina, entre otros.

El NOI puede codificar toda o parte de la proteína de interés ("POI"), o un mutante, homólogo o variante de la misma. Por ejemplo, el NOI puede codificar un fragmento de la POI que es capaz de funcionar in vivo de manera análoga a la proteína de tipo silvestre.

El término "mutante" incluye POI que incluyen una o más variaciones de aminoácidos de la secuencia de tipo silvestre. Por ejemplo, un mutante puede comprender una o más adiciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos.

Preferentemente, el NOI codifica un único POI o un mutante, homólogo o variante del mismo. En una realización altamente preferida, el NOI no codifica una proteína de fusión. Como se usa en esta invención, la expresión "proteína de fusión" se usa en su sentido convencional para referirse a una entidad que puede comprender dos o más actividades proteicas, unidas por un enlace peptídico para formar una única proteína quimérica. Una proteína de fusión está codificada por un único polinucleótido dirigido por un único promotor.

El genoma viral del procedimiento de la presente invención puede comprender al menos uno, pero opcionalmente puede comprender dos o más NOI. Para que se expresen dos o más NOI, puede haber dos o más unidades de transcripción dentro del genoma del vector, una para cada NOI. Sin embargo, de la bibliografía se desprende que los vectores retrovirales alcanzan los títulos más altos y las propiedades de expresión génica más potentes si se

mantienen genéticamente simples [documento WO96/037623; Bowtell y col., (1988) J. Virol. 62, 2464; Correll y col., (1994) Blood 84, 1812; Emerman y Temin (1984) Cell 39, 459; Ghattas y col., (1991) Mol. Cell. Biol. 11, 5848]. Por lo tanto, es preferible usar un sitio de entrada de ribosoma interno (IRES) para iniciar la traducción de la segunda secuencia (y posterior) de codificación en un mensaje policistrónico (o como se usa en esta invención, "multicistrónico") [Adam y col. (1991) J. Virol. 65, 4985].

La inserción de elementos IRES en vectores retrovirales es compatible con el ciclo de replicación retroviral y permite la expresión de múltiples regiones de codificación a partir de un único promotor (Adam y col (como arriba); Ngoi y col (2004) Curr Gene Ther 4(1):15-31; Chen y col. (1993) J. Virol 67:2142-2148). Cuando se ubican entre los marcos de lectura abiertos en un ARN, los elementos IRES permiten una traducción eficiente del marco de lectura abierto aguas abajo al promover la entrada del ribosoma en el elemento IRES seguido del inicio de la traducción aguas abajo.

Como se usa en esta invención, el término "cistrón" se refiere a un segmento de ácido nucleico que corresponde a una cadena polipeptídica, que puede comprender los codones de inicio (iniciación) y parada (terminación) de traducción relevantes. Un ARNm multicistrónico es una transcripción de ARNm con más de un cistrón y, por lo tanto, codifica más de un polipéptido.

Según el documento WO 97/14809, las secuencias IRES se encuentran típicamente en la región 5' no codificante de los genes. Además de las de la bibliografía, pueden encontrarse empíricamente buscando secuencias genéticas que afectan la expresión y luego determinando si esa secuencia afecta el ADN (es decir, actúa como un promotor o potenciador) o solo el ARN (actúa como una secuencia IRES).

Los elementos IRES de PV, EMCV y virus de la enfermedad vesicular porcina se han utilizado previamente en vectores retrovirales (Coffin y col, como se indicó anteriormente).

El término "IRES" incluye cualquier secuencia o combinación de secuencias que funcionan como o mejoran la función de un IRES.

Los IRES pueden ser de origen viral (tal como IRES EMCV, IRES PV o secuencias similares a FMDV 2) u origen celular (tal como IRES FGF2, IRES NRF, IRES Notch 2 o IRES EIF4).

Para que el IRES sea capaz de iniciar la traducción de cada NOI, debe ubicarse entre o antes de los NOI en el genoma del vector. Por ejemplo, para una secuencia multicistrónica que contiene n NOI, el genoma puede ser el siguiente: [NOI₁-IRES₁]... [IRES_(n-1)-NOI_n].

Para secuencias bi y tricistrónicas, el orden puede ser el siguiente: NOI₁-IRES₁-NOI₂ NOI₁-IRES₁-NOI₂-IRES₂-NOI₃.

Se pueden utilizar configuraciones alternativas de IRES y NOI. Por ejemplo, las transcripciones que contienen los IRES y NOI no necesitan ser dirigidas desde el mismo promotor.

Un ejemplo de esta disposición puede ser: IRES₁-NOI₁-promotor-NOI₂-IRES₂-NOI₃.

Preferentemente, en cualquier construcción que utilice un casete interno que tenga más de un IRES y NOI, los IRES pueden ser de orígenes diferentes, es decir, heterólogos entre sí. Por ejemplo, un IRES puede ser de EMCV y el otro IRES puede ser de poliovirus.

Aunque los IRES son una forma eficiente de coexpresar múltiples genes de un vector, otros procedimientos también son útiles y pueden usarse solos o en combinación con los IRES. Estas incluyen el uso de múltiples promotores internos en el vector [Overell y col. (1988), Mol Cell Biol. 8: 1803-8], o el uso de patrones de empalme alternativos que conducen a múltiples especies de ARN derivadas del genoma viral único que expresa los diferentes genes.

La presente descripción también se refiere a una célula que se ha transducido con un sistema de vector que puede comprender un genoma viral según el primer aspecto de la invención.

La célula puede transducirse in vivo, in vitro o ex vivo. Por ejemplo, si la célula es una célula de un sujeto mamífero, la célula puede retirarse del sujeto y transducirse lista para su reimplantación en el sujeto (transducción ex vivo). Como alternativa, la célula puede transducirse mediante transferencia génica directa in vivo, usando el sistema de vectores de la presente invención según técnicas estándar (tales como mediante inyección de reservas de vectores que expresan los NOI). Si la célula es parte de una línea celular que es estable en cultivo (es decir, que puede sobrevivir a numerosos pases y puede multiplicarse in vitro), entonces puede transducirse in vitro mediante técnicas estándar, por ejemplo, mediante la exposición de la célula a sobrenadantes virales que puede comprender vectores que expresan los NOI.

La célula puede ser cualquier célula que sea susceptible a la transducción. Si el sistema del vector es capaz de transducir células que no se dividen (por ejemplo, si es un sistema lentiviral), entonces la célula puede ser una célula que no se divide, tal como una neurona.

La presente descripción puede emplear casetes que pueden comprender uno o más NOI, que, en el caso de dos o más NOI, pueden estar operativamente unidos por un IRES. Estos casetes pueden usarse en un procedimiento para producir el genoma del vector en una célula productora.

La presente descripción también proporciona un vector de expresión que puede comprender dicho casete. La transfección de una célula adecuada con dicho vector de expresión debería dar como resultado una célula que exprese cada POI codificado por el NOI en el casete. La presente descripción también proporciona dicha célula transfectada.

La clonación del casete en un vector de expresión y la transfección de células con el vector (para dar la expresión del casete) se pueden llevar a cabo mediante técnicas bien conocidas en la técnica (tales como las descritas en Sambrook y col. (Molecular Cloning: A Laboratory) Manual, 2.^a edición, Cold Spring Harbor Laboratory press (1989)), y otros libros de texto de laboratorio).

Preferentemente, el casete puede comprender un promotor. Un casete que puede comprender dos o más NOI puede ser bicistrónico o tricistrónico, y puede comprender los siguientes elementos: Promotor-(NOI₁)-(IRES₁)-(NOI₂) Promotor-(NOI₁)-(IRES₁)-(NOI₂)-(IRES₂)-(NOI₃).

La presente descripción proporciona una composición farmacéutica, que puede comprender un genoma de vector según el segundo aspecto de la descripción y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable (incluyendo combinaciones de los mismos).

Las composiciones farmacéuticas pueden ser para uso humano o animal en medicina o investigación humana y veterinaria, y pueden comprender típicamente uno cualquiera o más de un diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Los vehículos o diluyentes aceptables para uso terapéutico son bien conocidos en la técnica farmacéutica y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (AR Gennaro edit. 1985). La elección del vehículo farmacéutico, excipiente o diluyente puede seleccionarse con respecto a la vía de administración prevista y la práctica farmacéutica estándar. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender como -o además de- el vehículo, excipiente o diluyente cualquier aglutinante(s), lubricante(s), agente(s) de suspensión, agente(s) de recubrimiento, agente(s) solubilizante(s) adecuado(s).

Se pueden proporcionar conservantes, estabilizadores, colorantes e incluso agentes aromatizantes en la composición farmacéutica. Los ejemplos de conservantes incluyen benzoato de sodio, ácido sórbico y ésteres de ácido p-hidroxibenzoico. También se pueden usar antioxidantes y agentes de suspensión.

Puede haber diferentes requisitos de composición/formulación que dependen de los diferentes sistemas de entrega. A modo de ejemplo, la composición farmacéutica puede formularse para suministrarse usando una minibomba o por una vía mucosa, por ejemplo, como un pulverizador nasal o aerosol para inhalación o solución ingerible, o parenteralmente donde la composición se formula mediante una forma inyectable, para el suministro, por ejemplo, por vía intravenosa, intramuscular o subcutánea. Como alternativa, la formulación puede estar diseñada para ser suministrada por ambas vías.

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

Cuando sea adecuado, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse por inhalación, en forma de supositorio o pesario, típicamente en forma de una loción, solución, crema, pomada o polvos de uso externo, mediante el uso de un parche para la piel, por vía oral en forma de comprimidos que contienen excipientes tales como almidón o lactosa o tiza, o en cápsulas u óvulos solos o mezclados con excipientes, o en forma de elixires, soluciones o suspensiones que contienen agentes aromatizantes o colorantes, o pueden inyectarse por vía parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa, intramuscular o subcutánea. Para la administración parenteral, las composiciones pueden usarse mejor en forma de una solución acuosa estéril, que puede contener otras sustancias, por ejemplo, suficientes sales o monosacáridos para hacer que la solución sea isotónica con la sangre. Para la administración bucal o sublingual, las composiciones pueden administrarse en forma de comprimidos o pastillas que pueden ser formuladas de manera convencional.

Típicamente, un médico determinará la dosis real que será más adecuada para un sujeto individual y variará con la edad, el peso y la respuesta del paciente en particular y la gravedad de la afección. Las dosificaciones a continuación son ejemplares del caso promedio. Por supuesto, puede haber casos individuales donde se merecen intervalos de dosificación más altos o más bajos.

Las composiciones (o partes componentes de las mismas) de la presente descripción pueden administrarse por vía oral. Además, o como alternativa, las composiciones (o partes componentes de las mismas) de la presente descripción pueden administrarse por inyección directa. Además, o como alternativa, las composiciones (o partes componentes de las mismas) pueden administrarse por vía tópica. Además, o como alternativa, las composiciones (o partes

componentes de las mismas) pueden administrarse por inhalación. Además, o como alternativa, las composiciones (o partes componentes de las mismas) también pueden administrarse mediante uno o más de: medios de administración parenteral, mucosa, intramuscular, intravenosa, subcutánea, intraocular o transdérmica, y están formuladas para dicha administración.

A modo de ejemplo adicional, la composición farmacéutica de la presente descripción puede administrarse según un régimen de 1 a 10 veces por día, tal como una o dos veces por día. El nivel de dosis específico y la frecuencia de dosificación para cualquier paciente en particular se pueden variar y dependerán de una diversidad de factores que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la estabilidad metabólica y la duración de la acción de ese compuesto, la edad, el peso corporal, en general salud, sexo, dieta, modo y tiempo de administración, tasa de excreción, combinación de fármacos, la gravedad de la afección particular y el huésped sometido a terapia.

El término "administrado" también incluye, pero no se limita a, suministro por vía mucosa, por ejemplo, como un pulverizador nasal o aerosol para inhalación o como una solución ingerible; una vía parenteral donde el suministro se realiza mediante una forma inyectable, tal como, por ejemplo, una vía intravenosa, intramuscular o subcutánea.

Por lo tanto, una o más de las siguientes vías pueden administrar la composición farmacéutica de la presente descripción: administración oral, inyección (tal como inyección directa), tópica, inhalación, administración parenteral, administración mucosa, administración intramuscular, administración intravenosa, administración subcutánea, administración intraocular o administración transdérmica.

Las composiciones farmacéuticas que pueden comprender una cantidad efectiva de vector que puede comprender un resto modulador identificado operativamente unido a un NOI pueden usarse en el tratamiento de trastornos, tales como los enumerados en el documento WO 98/09985. Para facilitar la referencia, ahora se proporciona parte de esa lista: actividad inhibidora de macrófagos y/o inhibidora de células T y, por lo tanto, actividad antiinflamatoria; actividad antiinmune, es decir, efectos inhibidores contra una respuesta inmune celular y/o humoral, que incluye una respuesta no asociada con inflamación; enfermedades asociadas con virus y/u otros patógenos intracelulares; inhibir la capacidad de los macrófagos y las células T para adherirse a los componentes de la matriz extracelular y la fibronectina, así como la expresión del receptor Fas regulada positivamente en las células T; inhibir la reacción inmune no deseada y la inflamación, incluida la artritis, incluida la artritis reumatoide, inflamación asociada con hipersensibilidad, reacciones alérgicas, asma, lupus eritematoso sistémico, enfermedades del colágeno y otras enfermedades autoinmunes, inflamación asociada con la aterosclerosis, arteriosclerosis, enfermedad aterosclerótica del corazón, lesión por reperusión, arresto cardíaco, infarto de miocardio, trastornos inflamatorios vasculares, síndrome de distrés respiratorio, u otras enfermedades cardiopulmonares, inflamación asociada con úlcera péptica, colitis ulcerosa y otras enfermedades del tracto gastrointestinal, fibrosis hepática, cirrosis hepática u otras enfermedades hepáticas, tiroiditis u otras enfermedades de las glándulas, glomerulonefritis u otras enfermedades renales y urológicas, otitis u otras enfermedades otorrinolaringológicas, dermatitis u otras enfermedades de la piel, enfermedades periodontales u otras enfermedades de los dientes, orquitis o epididimoorquitis, infertilidad, traumatismo orquídeo u otras enfermedades testiculares inmunorrelacionadas, disfunción placentaria, insuficiencia placentaria, aborto habitual, eclampsia, preeclampsia y otras enfermedades ginecológicas inmunorrelacionadas e/o inflamatoriasrelacionadas, uveítis posterior, uveítis intermedia, uveítis anterior, conjuntivitis, coriorretinitis, uveorretinitis, neuritis óptica, inflamación intraocular, por ejemplo, retinitis o edema macular cistoide, oftalmía simpática, escleritis, retinitis pigmentosa, componentes inmunes e inflamatorios de la enfermedad del gorro frigio degenerativa, componentes inflamatorios de traumatismo ocular, inflamación ocular causada por infección, vitreorretinopatías proliferativas, neuropatía óptica isquémica aguda, cicatrices excesivas, por ejemplo, después de la cirugía de filtración de glaucoma, reacción inmune y/o de inflamación frente a implantes oculares y otras enfermedades oftálmicas inmunorrelacionadas e inflamatoriasrelacionadas, inflamación asociada con enfermedades o afecciones o trastornos autoinmunes donde, tanto en el sistema nervioso central (SNC) como en cualquier otro órgano, la supresión inmune y/o de inflamación sería beneficiosa, enfermedad de Parkinson, complicación y/o efectos secundarios del tratamiento de la enfermedad de Parkinson, demencia relacionada a SIDA, encefalopatía compleja relacionada a SIDA, enfermedad de Devic, corea de Sydenham, enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades, afecciones o trastornos degenerativos del SNC, componentes inflamatorios de apoplejías, síndrome postpolio, componentes inmunes e inflamatorios de trastornos psiquiátricos, mielitis, encefalitis, panencefalitis esclerosante aguda, encefalomielitis, neuropatía aguda, neuropatía subaguda, neuropatía crónica, síndrome de Guillain-Barre, corea de Sydenham, miastenia gravis, pseudotumor cerebral, síndrome de Down, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, componentes inflamatorios de compresión del SNC o traumatismo del SNC o infecciones del SNC, componentes inflamatorios de atrofas y distrofias musculares, y enfermedades, afecciones o trastornos inmunorrelacionados e inflamatoriosrelacionados, del sistema nervioso central y periférico, inflamación postraumática, shock séptico, enfermedades infecciosas, complicaciones inflamatorias o efectos secundarios de la cirugía, trasplante de médula ósea u otras complicaciones y/o efectos secundarios de trasplantes, complicaciones inflamatorias e inmunes y efectos secundarios de terapia génica, por ejemplo, debido a la infección con un vehículo vírico, o la inflamación asociada a SIDA, para suprimir o inhibir una respuesta humoral y/o celular, para tratar o mejorar enfermedades proliferativas de monocitos o leucocitos, por ejemplo, leucemia, reduciendo la cantidad de monocitos o linfocitos, para la prevención y/o tratamiento del rechazo del injerto en casos de trasplante de células, tejido y órganos naturales o artificiales, tales como la córnea, médula ósea, órganos, lentes, marcapasos, tejido de piel natural o artificial. Los trastornos específicos relacionados con el cáncer incluyen, pero no se limitan a: tumores sólidos; tumores

nacidos en sangre tales como leucemias; metástasis tumorales; tumores benignos, por ejemplo, hemangiomas, neuromas acústicos, neurofibromas, tracomias y granulomas piógenos; artritis reumatoide; psoriasis; enfermedades angiogénicas oculares, por ejemplo, retinopatía diabética, retinopatía del prematuro, degeneración macular, rechazo del injerto corneal, glaucoma neovascular, fibroplasia retrolental, rubeosis; síndrome de Osler-Webber; angiogénesis miocárdica; neovascularización de la placa; telangiectasia; articulaciones hemofílicas; angiofibroma; granulación de heridas; colaterales coronarios; colaterales cerebrales; malformaciones arteriovenosas; angiogénesis de extremidad isquémica; glaucoma neovascular; fibroplasia retrolental; neovascularización diabética; enfermedades relacionadas con *Helicobacter*, fracturas, vasculogénesis, hematopoyesis, ovulación, menstruación y placentación.

- 10 La presente invención se ilustrará adicionalmente en los siguientes ejemplos que se dan solo con fines ilustrativos y no pretenden limitar la invención de ninguna manera.

EJEMPLOS

15 EJEMPLO 1

Eliminación del elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE) para aumentar el perfil de seguridad de los vectores virales

- 20 Se realizó un estudio para evaluar los efectos de la eliminación de WPRE sobre los niveles de expresión de proteínas de los vectores retrovirales.

PROCEDIMIENTOS

- 25 *Construcción de los plásmidos de transferencia 'pELNS Luc ADB678' 'pELNS LucNoX ADB679' y 'pELNS LucNoWADB680'*

- 30 Sobre la base del plásmido pELNS-NY-ESO ADB152 (figura 1) se han construido dos variantes designadas pELNS-NY-ESO NoX ADB693 y pELNS-NY-ESO NoW ADB694. Para la construcción de pELNS-NY-ESO NoX ADB693, la región WPRE del plásmido pELNS-NY-ESO ADB152 se modificó mediante amplificación por PCR usando cebador directo [secuencia de nucleótidos: cgGTCGACaatcaacctctggattac] y cebador inverso [secuencia de nucleótidos: cgGAATTCgacaacaccacggatgumgtt utilizando un kit de PCR de ADN polimerasa Platinum Taq (Life Technologies Catalog # 11304011). El producto de PCR se digirió con enzimas de restricción Sall y EcoRI seguido de purificación usando el kit Zymo Clean & Concentrator (Zymo Research cat. n.º D4005). El fragmento purificado se ligó a continuación en el fragmento de la cadena principal del plásmido pELNS-NY-ESO ADB152 digerido con Sall_EcoRI para formar el plásmido pELNS-NY-ESO NoX ADB693 (figura 2).

- 40 Para la generación del plásmido pELNS-NY-ESO NoW ADB694, dos oligonucleótidos 5'-fosforilados [secuencia de oligonucleótidos de la cadena superior: tcgacTCTAGAg; secuencia de oligonucleótidos de la cadena inferior: aattcTCTAGAg] se hibridaron para formar un enlazador que contiene sitios Sall_XbaI_EcoRI con extremos de enzima de restricción Sall y EcoRI 'pegajosos':

```

      T C G A C T C T A G A G
        | | | | | | |
      G A G A T C T C T T A A
  
```

- 45 El enlazador hibridado se ligó a continuación en el fragmento de la cadena principal del plásmido pELNS-NY-ESO ADB152 digerido con Sall_EcoRI para formar el plásmido pELNS-NY-ESO NoW ADB694 (figura 3).

- 50 Luego se utilizaron los plásmidos pELNS-NY-ESO ADB152, pELNS-NY-ESO NoX ADB693 y pELNS-NY-ESO NoW ADB694 para generar los plásmidos pELNS Luc ADB678, pELNS LucNoX ADB679 y pELNS LucNoW ADB680 respectivamente.

- 55 Para la generación del plásmido pELNS Luc ADB678, se amplificó un gen reportero de luciferasa [flanqueado por un sitio de enzima de restricción NheI en el extremo 5' y un sitio Sall en el extremo 3'] del plásmido pELNS Tomato-Luc ADB73 (figura 4) mediante PCR utilizando cebador directo [secuencia de nucleótidos: ACTGGCTAGCCACCATggaagatgccaaaaca] y cebador inverso [secuencia de nucleótidos: gaggttgattgtcgacttac]. El producto de PCR se digirió con enzimas de restricción NheI y Sall seguido de purificación usando el kit Zymo Clean & Concentrator. El fragmento purificado se ligó a continuación en los fragmentos de la cadena principal de los plásmidos pELNS-NY-ESO ADB152, pELNS-NY-ESO NoX ADB693 y pELNS-NY-ESO NoW ADB694 digeridos con NheI_Sall para generar los plásmidos pELNS Luc ADB678, pELNS LucNoX ADB679 y pELNS LucNoW ADB680 respectivamente (figuras 5-7).

Producción de vector lentiviral recombinante que expresa luciferasa

El vector lentiviral recombinante se produjo usando la línea celular HEK293T humana como huésped por transfección transitoria de 4 plásmidos: un plásmido de transferencia que contiene el casete de expresión del gen reportero de luciferasa y tres plásmidos de empaquetamiento que expresan el gen estructural VIH-1 gag-pol, el gen accesorio rev o glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular de envoltura viral (VSV-G). El sobrenadante se recogió 48 horas después de la transfección y los restos celulares se eliminaron por filtración a través de un filtro de 0,45 µm. Las partículas del vector lentiviral se concentraron luego del sobrenadante clarificado por ultracentrifugación a 10.000 x g durante 16-18 horas. El sedimento de partículas virales finalmente se resuspendió en un volumen adecuado de medio de cultivo.

El vector lentiviral producido con pELNS Luc ADB678 [elemento WPRE de longitud completa], pELNS LucNoX ADB679 [elemento WPRE truncado por la eliminación del promotor X y la proteína X truncada en el extremo 3'] o el plásmido de transferencia pELNS LucNoW ADB680 [elemento WPRE reemplazado por 6 nucleótidos, TCTAGA] se designó como vectores 'Luc', 'LucNoX' o 'LucNoW' respectivamente.

Medición del nivel de partículas de vector intactas en la preparación del vector lentiviral

El nivel de partículas del vector lentiviral intactas se determinó usando el kit de titulación de lentivirus QuickTiter (Cell Biolabs Inc, cat. n.º VPK-107). Este kit de ensayo mide solo las proteínas de la cápside gag p24 asociadas a la partícula del vector lentiviral pero no las proteínas p24 libres presentes en la preparación del vector viral. Por lo tanto, los resultados de este ensayo pueden usarse como un sustituto para el título biológico del vector lentiviral.

Transducción del vector lentiviral de células objetivo: línea celular SupT1 y células T primarias de donantes y recolección de sedimentos celulares

La expresión del gen reportero de luciferasa en las células objetivo se evaluó mediante la transducción de la línea celular SupT1 humana o de las células T primarias de diversos donantes. Para la transducción de células SupT1, las células SupT1 se sedimentaron y se resuspendieron en medio de cultivo fresco. Estas células se sembraron a una densidad de 1×10^6 células/pocillo en 0,5 ml por pocillo en una placa de 24 pocillos. Luego, se añadieron al pocillo 0,5 ml de vector lentiviral [Luc, LucNoX o LucNoW]. Las células SupT1 transducidas se cosecharon como sedimentos celulares [300 x g durante 5 minutos] para la medición de la expresión de luciferasa 48 horas después.

Para la transducción de células T primarias de los donantes, los leucocitos, incluidas las células T, se aislaron de la sangre total del donante utilizando el kit Lymphoprep (Axis-Shield, cat # NYC-1114547) según las instrucciones del fabricante. Los leucocitos CD14 y CD25 positivos se eliminaron de esta población incubando con la cantidad adecuada de microperlas CD14 y CD25 humanas (Miltenyi Biotec cat # 130-050-201, 130-092-983) seguido de la separación con columnas Miltenyi LS (Miltenyi Biotec cat # 130-042-401). Las cantidades adecuadas de las células restantes se incubaron con una cantidad adecuada de interleucina-2 recombinante y una cantidad adecuada de perlas anti-CD3/anti-CD28. Después de una incubación durante la noche, estas células se transfirieron a una placa de 24 pocillos a 10^6 células/pocillo en un volumen de 1 ml. Luego se añadió al pocillo 1 ml de vector lentiviral [Luc, LucNoX o LucNoW]. Las células T primarias transducidas se cosecharon como sedimentos celulares [300 x g durante 5 minutos] para la medición de la expresión de luciferasa 48 horas después.

Expresión de luciferasa activa en células SupT1 trasducidas con diluciones en serie de vectores Luc, LucNoX y LucNoW que expresan el gen reportero de luciferasa

Los sedimentos de células SupT1 se incubaron con la cantidad adecuada de tampón de lisis Glo frío (Promega E2661) en hielo durante > 5 minutos después de agitar vigorosamente con formación de vórtice durante 1 minuto. Los lisados celulares se mantuvieron luego en hielo hasta su uso. Se generó una curva estándar de luciferasa usando la cantidad adecuada de luciferasa recombinante QuantiLum (Promega E1701) diluida en tampón de lisis Glo. Luego, se añadieron las cantidades adecuadas de estándares y muestras a los pocillos de una placa blanca de 96 pocillos de pared sólida (Greiner Bio Cat # 655083). A cada pocillo se añadieron 100 µl de sustrato de ensayo de luciferasa Bright-Glo™ reconstituido (Promega E2620) equilibrado a temperatura ambiente. La luminiscencia (unidad relativa de luz, RLU) de cada pocillo correspondiente al nivel de expresión de luciferasa se midió mediante un lector de placas Wallac Victor2 1420 (Perkin Elmer). La luminiscencia de cada pocillo de muestra se convirtió a la concentración de luciferasa activa en ng/ml usando una curva estándar.

RESULTADOS

Medición del nivel de partículas de vector intactas en la preparación del vector lentiviral

Como se muestra en la figura 8, los niveles de proteínas de la cápside gag p24 asociadas con el vector lentiviral fueron similares en las preparaciones de vectores lentivirales Luc, LucNoX y LucNoW. Esto sugiere que estas preparaciones de vectores lentivirales contenían un nivel similar de partículas de vectores. El medio de cultivo completo [medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10 % v/v y GlutaMaX 2 mM] que se utilizó para resuspender los sedimentos de vectores virales de estos vectores no contribuyó a ninguna

señal de fondo.

Transducción del vector lentiviral de células objetivo: línea celular SupT1 y células T primarias de donantes y recolección de sedimentos celulares

Los resultados mostrados en la figura 9 muestran que las células SupT1 transducidas con el vector lentiviral LucNoX producido con plásmidos de transferencia pELNS LucNoX ADB679 expresaron actividades de luciferasa ligeramente mejores que aquellas con el vector de control Luc producido con el plásmido pELNS Luc ADB678 en un intervalo de diluciones de vectores. Esto se espera ya que el vector lentiviral producido con un plásmido de transferencia que contiene un mutante WPRE que no expresa la proteína X se ha demostrado previamente que es funcionalmente similar al WPRE de longitud completa con respecto a la mejora de la expresión transgénica [González-Murillo A. y col. (2010). Hum Gene Ther 21 (5):623-30; Schambach A. y col. (2006) Gene Ther 13 (7):641-5].

Además, las células transducidas con el vector lentiviral LucNoW producido con el plásmido de transferencia pELNS LucNoW ADB680 expresaron actividades de luciferasa ligeramente mejores que aquellas con el control Luc también, en un intervalo de diluciones de vectores (figura 9). Esto muestra que seis nucleótidos, TCTAGA (un sitio de enzima de restricción XbaI) pueden usarse en lugar de un elemento WPRE funcional.

Expresión de luciferasa activa en células SupT1 o células T primarias transducidas con vectores Luc, LucNoX y LucNoW que expresan el gen reportero de luciferasa

Para evaluar aún más si los resultados podrían reproducirse en las células T primarias, el experimento anterior se repitió utilizando las dosis más altas de los mismos lotes de vectores Luc, LucNoX y LucNoW. Además, se usó el mismo lote de células SupT1 como control.

Como se muestra en la figura 10, las células T primarias aisladas de cuatro donantes diferentes, así como las SupT1 transducidas con el vector lentiviral LucNoX expresaron actividades de luciferasa más altas que aquellas con el vector de control Luc.

Además, las células transducidas con el vector lentiviral LucNoW expresaron mayores actividades de luciferasa que aquellas con el control Luc o los vectores LucNoX (figura 10). Esto está según los resultados del experimento anterior de que todo el elemento WPRE podría reemplazarse por un elemento espaciador corto, sin ningún impacto en el título del vector.

EJEMPLO 2

Construcción de los plásmidos NoWPRE 0 mer, NoWPRE 3 mer NoWPRE 10 mer, No WPRE 20 mer, No WPRE 30 mer NoWPRE 40 mer y NoWPRE 50 mer.

El plásmido "Luc NoW 0 mer" se generó digiriendo el plásmido ADB680 (figura 7) con Sall y EcoRI. Luego, el fragmento de la cadena principal del vector se rellenó con polimerasa T4 seguido de ligadura. El nuevo plásmido ya no contenía sitios Sall y EcoRI (figura 2).

La generación de los plásmidos fue mediante la hibridación de dos oligos complementarios para formar la secuencia de relleno (seleccionada al azar) con extremos compatibles con el sitio de restricción Sall y EcoRI listos para ligar (véase la tabla 1). Las secuencias de relleno hibridadas se ligaron luego en la cadena principal del plásmido ADB 680 digerido con Sall y EcoRI para formar los plásmidos correspondientes. Estos plásmidos contenían un sitio de restricción Sall y EcoRI.

Tabla 1: Enlazador hibridado que contiene la secuencia de relleno con extremos compatibles con los sitios de restricción Sall y EcoRI listos para ligar (en negrita):

Longitud de la secuencia de relleno	Secuencias de enlazador
3 mer	Sall EcoRI
	TCGACT CTG
	GA GACTTAA
10 mer	Sall EcoRI
	TCGACG CAACTAGAAG
	GC GTTGATCTTC TTAA

20 mer	Sall EcoRI TCGACA CCAAGCTGGA CATCTACCCG GT GGTTCGACCT GTAGATGGGC TTAA
30 mer	Sall EcoRI TCGACC CGAAGGAGTA CTATAAACCG CCATACGGAG GG GCTTCCTCAT GATATTTGGC GGTATGCCTC TTAA
40 mer	Sall EcoRI TCGACG GCGAGTTTAA AACCTCTTGC TACATCGCCT CATCTGTGAG GC CGCTCAAATT TTGGAGAACG ATGTAGCGGA GTAGACACTC TTAA
50 mer	Sall EcoRI TCGACG TGACGAACAT GGGGCAGATT GCTTCCAGTG CTTGCTGGGC ATTGCTGATG GC ACTGCTTGTA CCCCGTCTAA CGAAGGTCAC GAACGACCCG TAACGACTAC TTAA

Las secuencias de relleno insertadas son, por lo tanto, las siguientes:

SEQ ID NO: 2 TCT

SEQ ID NO: 3 GCAACTAGAA

SEQ ID NO: 4 ACCAAGCTGGACATCTACCC

SEQ ID NO: 5 CCGAAGGAGTACTATAAACCGCCATACGGA

SEQ ID NO: 6 GGCGAGTTTAAACCTCTTGCTACATCGCCTCATCTGTGA

SEQ ID NO: 7

GTGACGAACATGGGGCAGATTGCTTCCAGTGCTTGGCATTGCTGAT

Producción de vector lentiviral recombinante que expresa luciferasa o NYESO-1 TCR

El vector lentiviral recombinante se produjo usando la línea celular HEK293T humana como huésped por transfección transitoria de 4 plásmidos: un plásmido de transferencia contiene un reportero de luciferasa o un casete de expresión génica del receptor de células T NYESO-1 (TCR) y tres plásmidos de empaquetamiento que expresan el gen estructural VIH-1 gag-pol, el gen accesorio rev o glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular de envoltura viral (VSV-G). El sobrenadante se recogió 48 horas después de la transfección y los restos celulares se eliminaron por filtración a través de un filtro de 0,45 µm. El sobrenadante viral clarificado se concentró luego por ultracentrifugación a 10.000 x g durante 16-18 horas. El sedimento de partículas virales se resuspendió luego en un volumen adecuado de medio de cultivo.

Los vectores lentivirales que comprenden luciferasa (Luc) o el receptor de células T NY-ESO1 (NY-ESO1) y que contienen el WPRE, el WPRE que carece del fragmento X, o que carece del WPRE, se indican como en la tabla 2:

Tabla 2: Un resumen del vector lentiviral producido usando diversos plásmidos transgénicos

ID del vector lentiviral	Transgén	Secuencia de WPRE o de relleno
Luc	luciferasa	WPRE de longitud completa
LucNoW 0 mer	luciferasa	WPRE eliminado

LucNoW 3 mer	luciferasa	WPRES reemplazado por la secuencia de 3-mer (TCT)
LucNoW 6 mer	luciferasa	WPRES reemplazado por la secuencia de 6-mer (TCTAGA)
LucNoW 10 mer	luciferasa	WPRES reemplazado por la secuencia de 10-mer (GCAACTAGAA)
LucNoW 20 mer	luciferasa	WPRES reemplazado por la secuencia de 20-mer (ACCAAGCTGG ACATCTACCC)
LucNoW 30 mer	luciferasa	WPRES reemplazado por la secuencia de 30-mer (CCGAAGGAGT ACTATAAACC GCCATACGGA)
LucNoW 40 mer	luciferasa	WPRES reemplazado por la secuencia de 40-mer (GGCGAGTTTA AAACCTCTTG CTACATCGCC TCATCTGTGA)
LucNoW 50 mer	luciferasa	WPRES reemplazado por la secuencia de 50-mer (GTGACGAACA TGGGGCAGAT TGCTTCCAGT GCTTGCTGGG CATTGCTGAT)
NY-ESO1 WPRES	NYESO-1 TCR	WPRES de longitud completa
NY-ESO1 WPRES NoX	NYESO-1 TCR	WPRES truncado: promotor X y proteína X parcial en el extremo 3' eliminado
NY-ESO1 NoW 6 mer	NYESO-1 TCR	WPRES reemplazado por la secuencia de 6-mer (TCTAGA)

Transducción del vector lentiviral de células objetivo: línea celular SupT1

5 La expresión del gen reportero de luciferasa o NYESO-1 TCR en células objetivo se evaluó mediante la transducción de una línea celular SupT1 humana. Para la transducción, las células SupT1 se sedimentaron y se resuspendieron en medio de cultivo fresco. Estas células se sembraron a una densidad de 1×10^6 células/pocillo a 0,5 ml por pocillo en una placa de 24 pocillos. A continuación, se añadieron 0,5 ml de vector lentiviral al pocillo.

10 Las células SupT1 transducidas se cosecharon como sedimentos celulares [300 x g durante 5 minutos] para la medición de la expresión de luciferasa 48 horas después. Para la medición de NYESO-1 TCR estas células se tiñeron con un anticuerpo específico generado contra la cadena beta del TCR y el % de células marcadas positivamente se determinó por citometría de flujo.

15 *Expresión de luciferasa activa en células SupT1 transducidas con vector lentiviral derivadas de plásmidos transgénicos que expresan luciferasa que contienen secuencias de relleno de reemplazo de WPRES o WPRES de longitud completa.*

20 Los sedimentos de células SupT1 se incubaron con la cantidad adecuada de tampón de lisis Glo frío (Promega E2661) en hielo durante > 5 minutos después de agitar vigorosamente con formación de vórtice durante 1 minuto. Los lisados celulares se mantuvieron luego en hielo hasta su uso. Se generó una curva estándar de luciferasa usando la cantidad adecuada de luciferasa recombinante QuantiLum (Promega E1701) diluida en tampón de lisis Glo. Luego se añadió la cantidad adecuada de estándares y muestras a los pocillos de una placa de 96 pocillos de pared sólida blanca (Greiner Bio Cat # 655083). Para cada pocillo se añadieron 100 µl de sustrato de ensayo de luciferasa Bright-Glo™ reconstituido (Promega E2620) equilibrado a temperatura ambiente. El lector de placas FLUOStar Omega (BMG LabTech) midió la luminiscencia (unidad relativa de luz, RLU) de cada pocillo correspondiente al nivel de expresión de luciferasa. La luminiscencia de cada pocillo de muestra se convirtió a la concentración de luciferasa activa en ng/ml usando la curva estándar.

30 Se prepararon cuatro preparaciones de vectores lentivirales individuales para cada plásmido transgénico. Los resultados en la figura 11 son de una preparación típica y representan la media de determinaciones por triplicado, normalizadas para dar la luminiscencia del vector Luc como 100 %. La expresión del transgén se reduce significativamente en ausencia de WPRES, pero esta expresión se puede restaurar mediante la adición de una "secuencia de relleno" de 3 a 50 nucleótidos.

35 *Expresión de NYESO-1 TCR en la superficie celular de células SupT1 transducidas con NY-ESO1 WPRES NoX o NY-ESO1 NoW 6mer*

Para evaluar si se pueden obtener resultados similares con el vector lentiviral que expresa el gen del receptor de

células T NYESO-1 (Robbins y J Immunol 180:9, 611), algunas células SupT1 se transdujeron con el vector lentiviral derivado de NYESO-1 que expresa el plásmido transgénico que contiene un WPRE NYESO1 WPRE NoX truncado o WPRE reemplazado por la secuencia de 6 nucleótidos [TCTAGA] NY-ESO1 NoW 6mer.

- 5 Después de la transducción, se reemplazó el medio de cultivo de las células SupT1 por tampón FACS [PBS, pH 7,4, sin calcio y magnesio suplementado con FBS al 2 % y EDTA 2 mM] que contenía anticuerpo conjugado 13.1β PE (Beckman Coulter IM2292) generado contra la subunidad Vβ de NYESO-1 TCR diluido a 1 μl por pocillo para una placa de 96 pocillos. El % de células marcadas positivamente en la población se determinó luego por citometría de flujo usando un citómetro de flujo Accuri C6 (BD BioSciences).

- 10 Los resultados como se muestra en la figura 12 muestra que las células transducidas con un vector que contiene una secuencia de relleno (NYESO1 NoW 6 mer) fueron capaces de producir un porcentaje similar de células que expresan NYESO1 TCR que las células transducidas con el vector que contiene el WPRE (NYESO1 WPRE NoX).

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para mejorar la transcripción de al menos un transgén en un vector de expresión lentiviral que comprende introducir una secuencia de nucleótidos de relleno (SNS) insertada en lugar de un elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE) aguas abajo del transgén, donde la expresión del transgén es mayor cuando se inserta la SNS en lugar del WPRE en comparación con el WPRE, y donde la SNS se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, 2, 4, 6 y 7, donde el transgén está bajo el control de un promotor EF1 α , y donde el transgén se expresa en células T
- 5
- 10 2. El procedimiento de la reivindicación 1, donde el vector se deriva de una especie viral seleccionada del grupo que consiste en virus de inmunodeficiencia humana (VIH), virus de inmunodeficiencia simia (SIV), virus maedi/visna (VMV), virus de artritis encefalitis caprina (CAEV), virus de anemia infecciosa equina (EIAV), virus de inmunodeficiencia felina (FIV) y virus de inmunodeficiencia bovina (BIV).

FIGURA 1

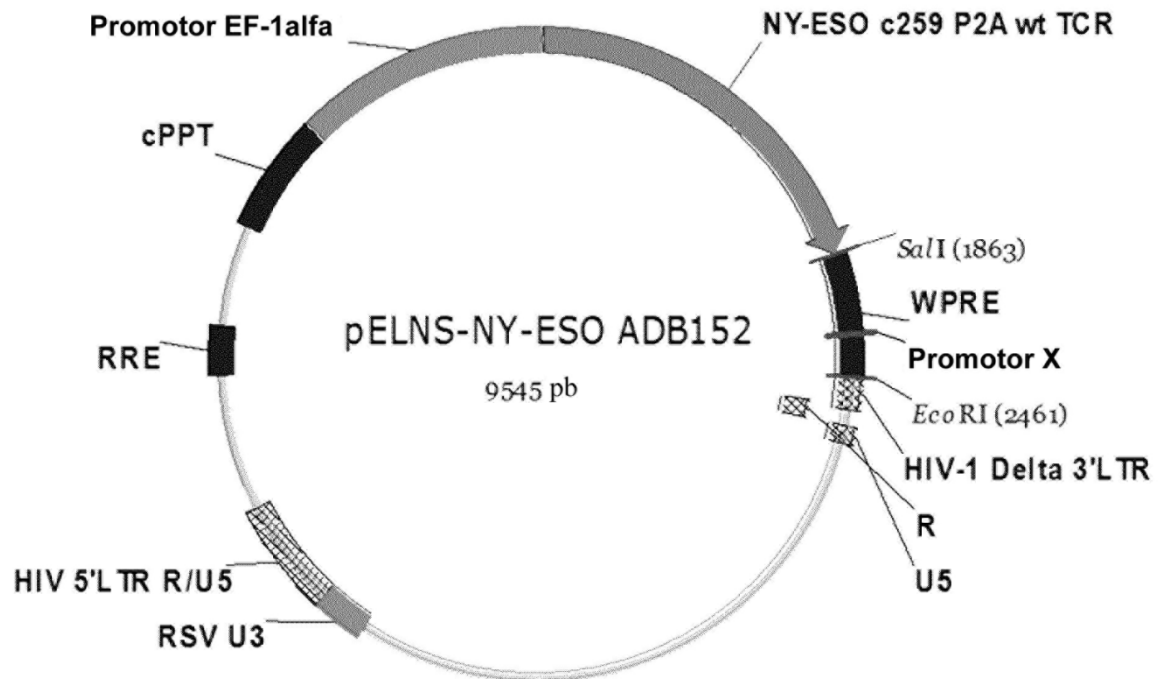


FIGURA 2

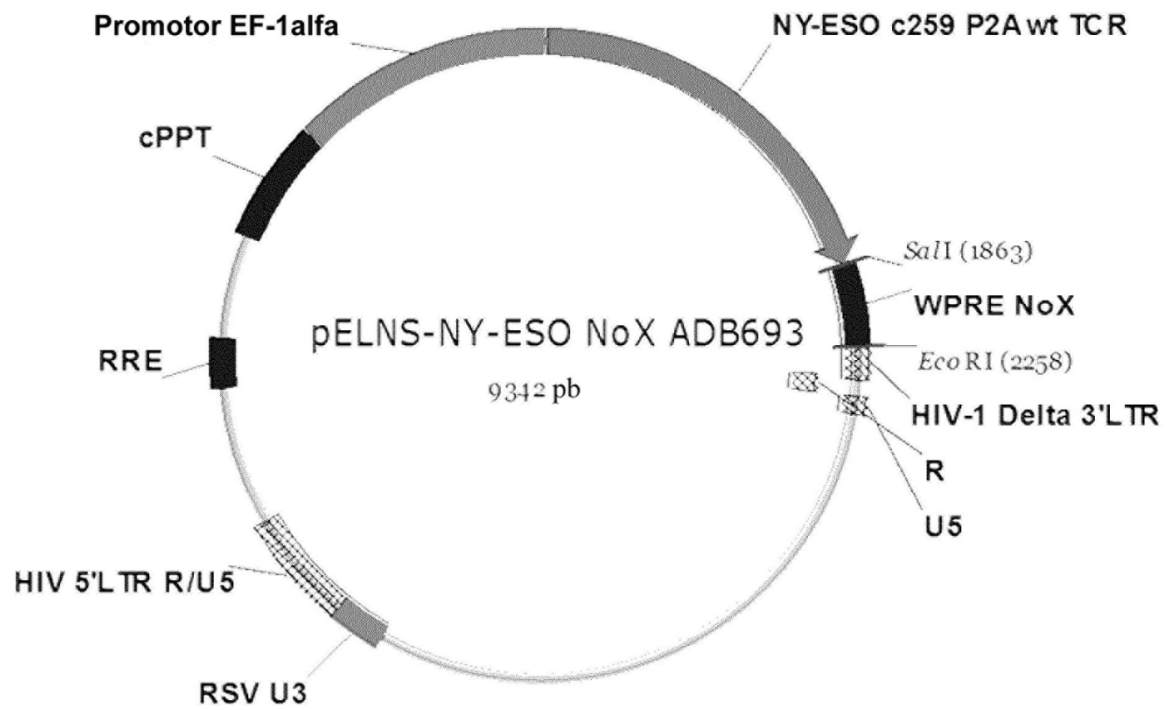


FIGURA 3

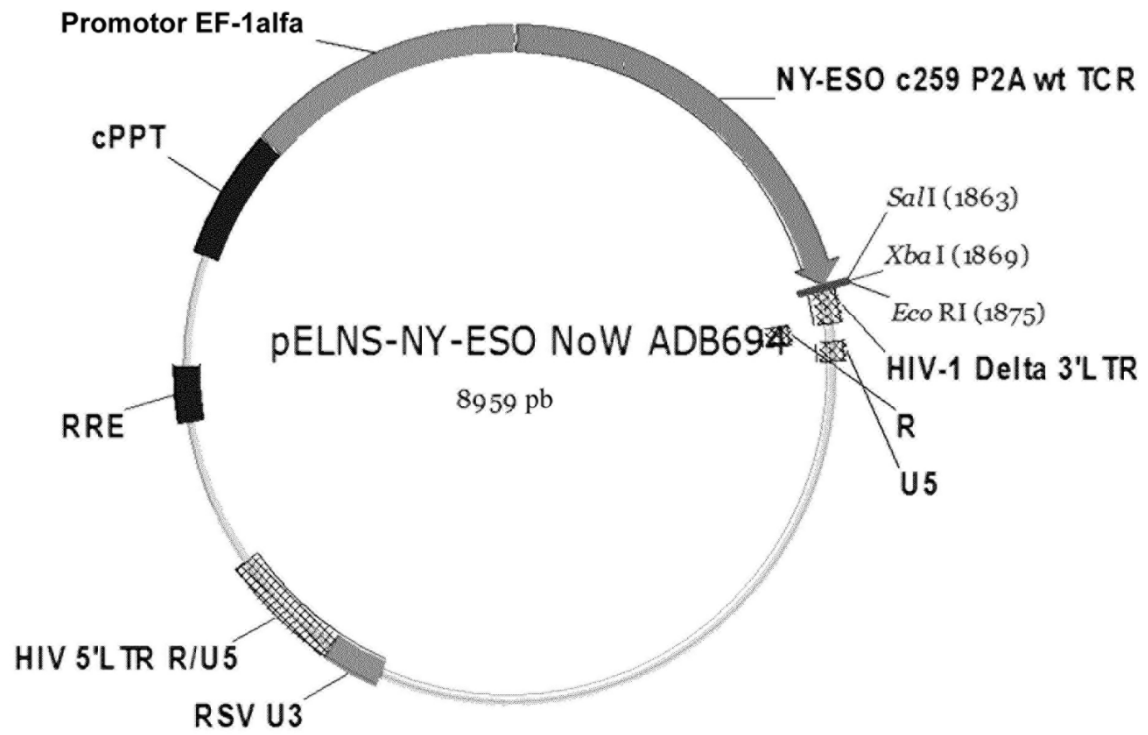


FIGURA 4

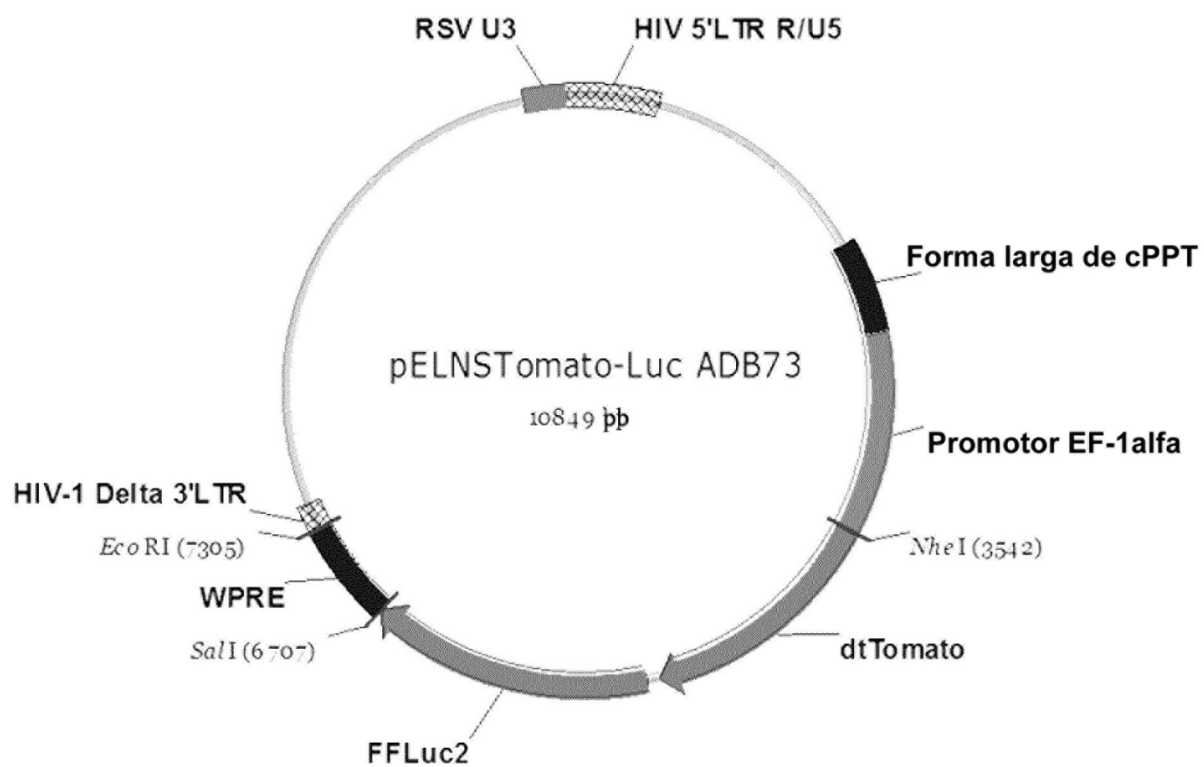


FIGURA 5

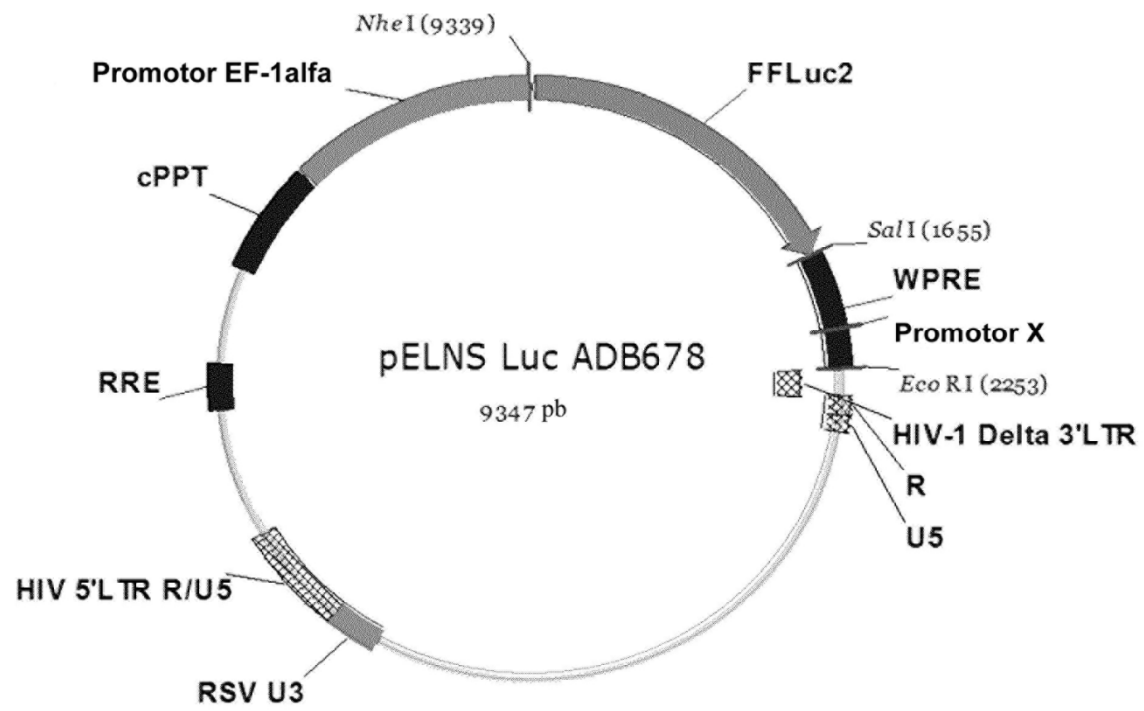


FIGURA 6

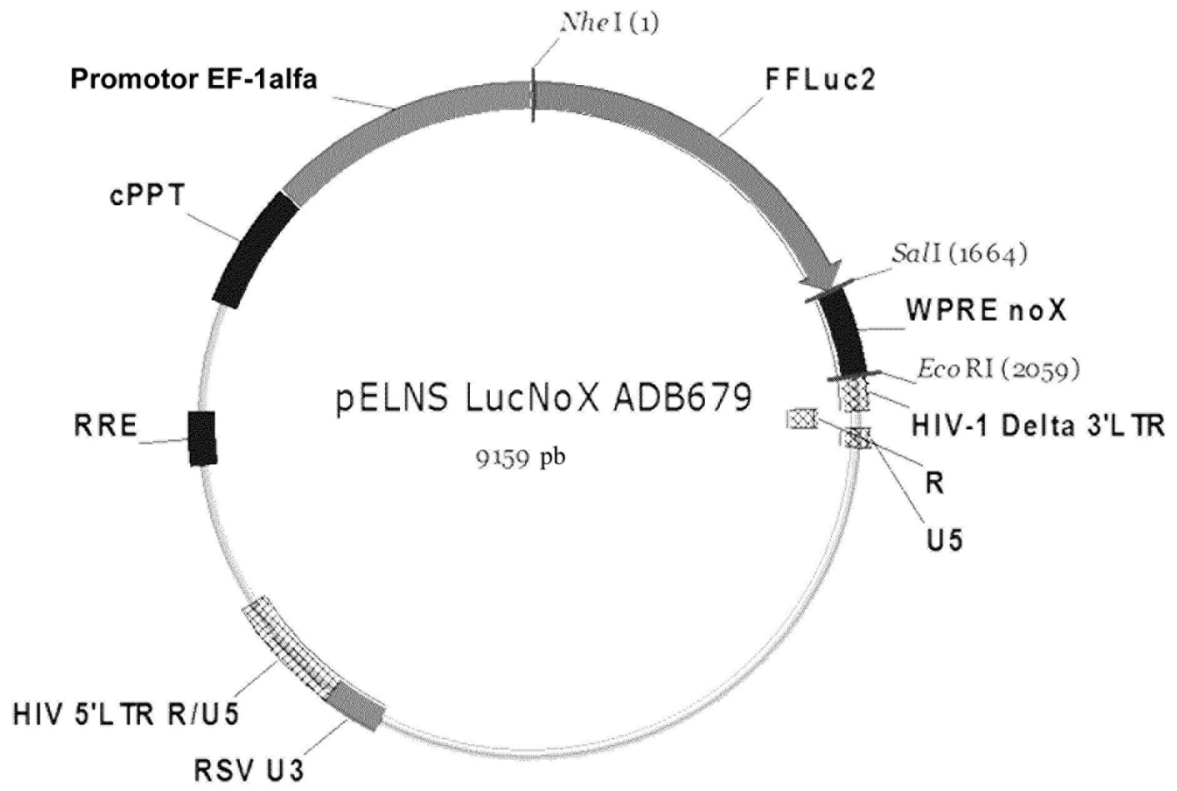


FIGURA 7

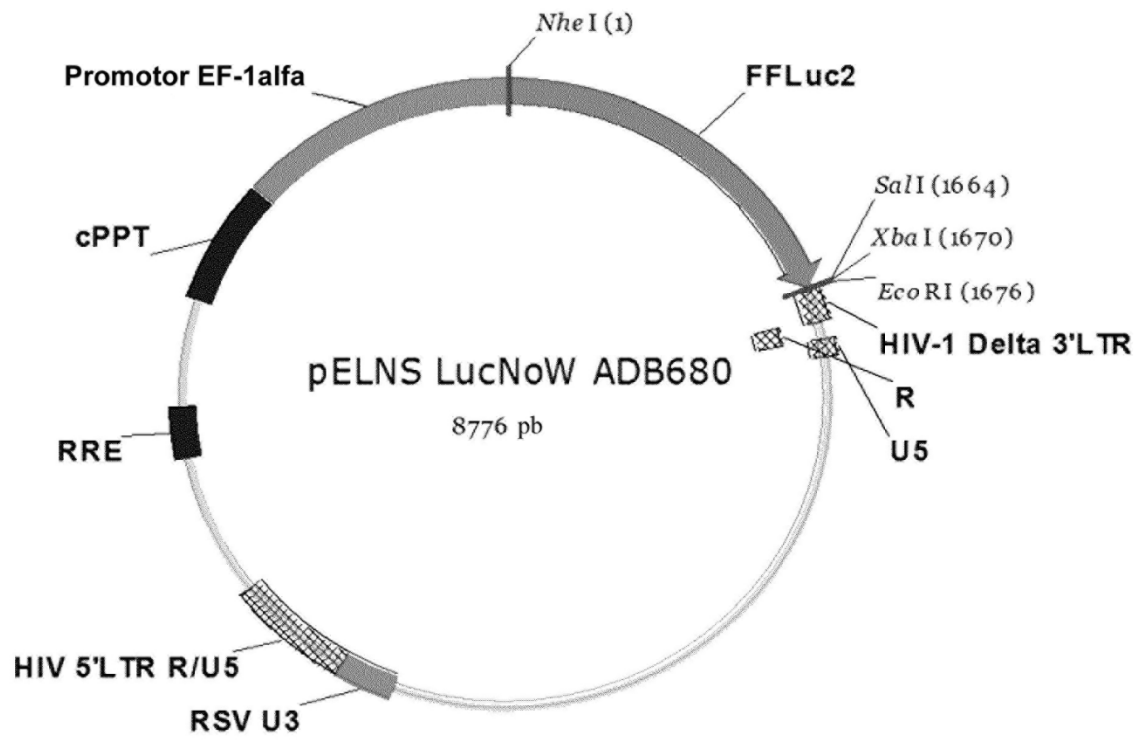


FIGURA 8

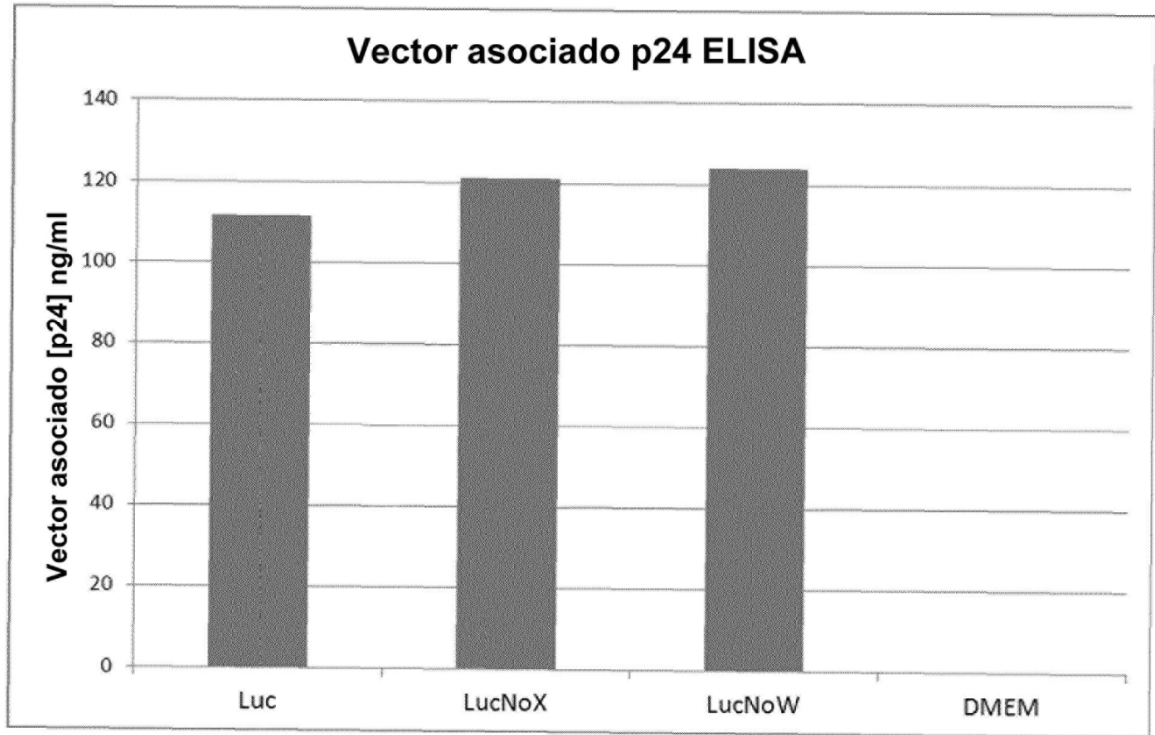


FIGURA 9

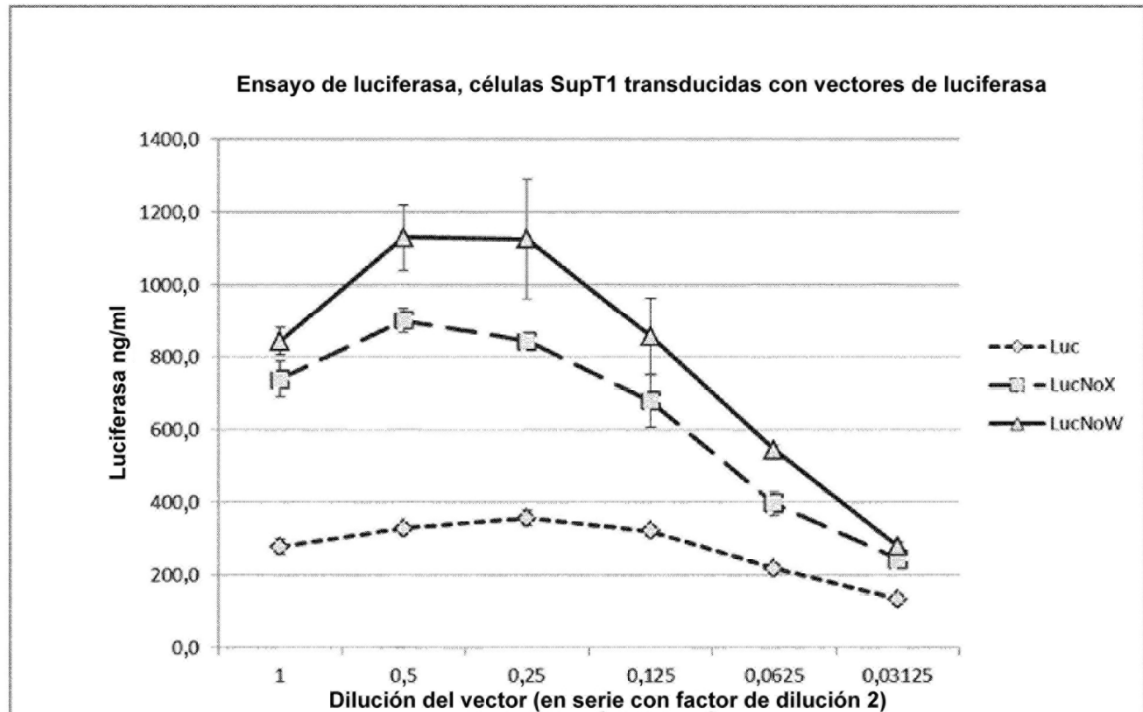


FIGURA 10

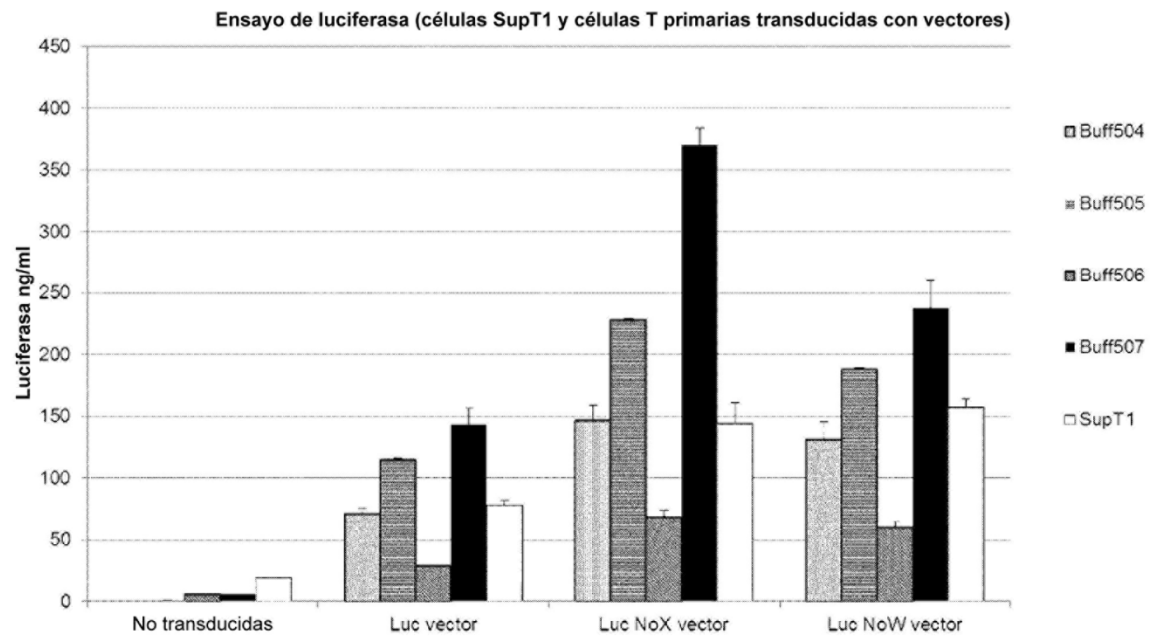
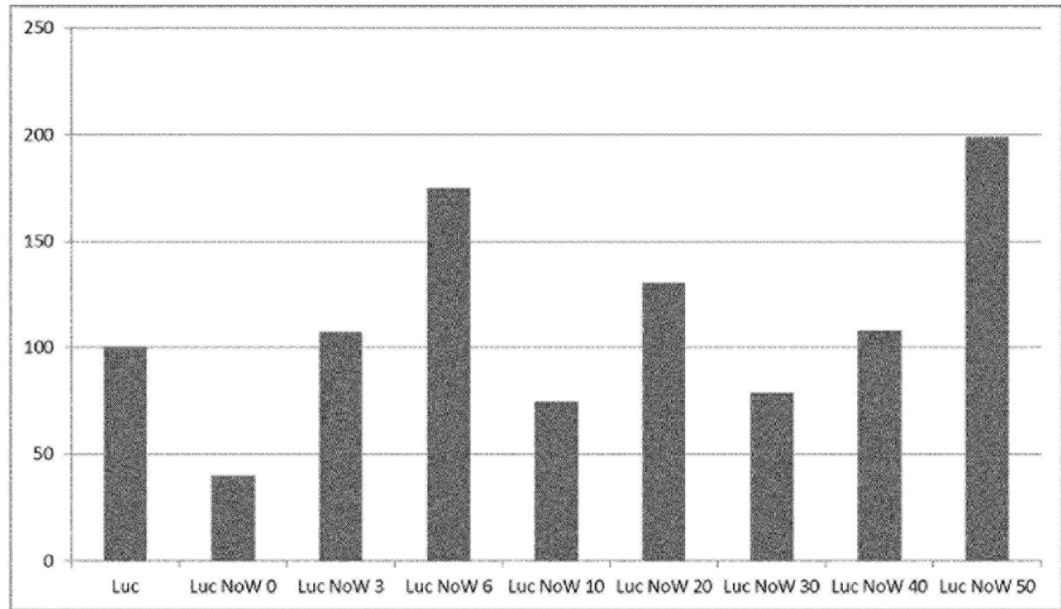


FIGURA 11

Luminiscencia/% control



VECTOR TRANSDUCIDO

FIGURA 12

