

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 748 377**

51 Int. Cl.:

C12N 15/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.12.2014 PCT/GB2014/053813**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.06.2015 WO15092440**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2014 E 14821255 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2019 EP 3083969**

54 Título: **Sistema de producción de vector vírico**

30 Prioridad:
20.12.2013 GB 201322798

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.03.2020

73 Titular/es:
**OXFORD BIOMEDICA (UK) LIMITED (100.0%)
Windrush Court, Transport Way
Oxford, OX4 6LT, GB**

72 Inventor/es:
**FARLEY, DANIEL y
MITROPHANOUS, KYRIACOS**

74 Agente/Representante:
ISERN JARA, Jorge

ES 2 748 377 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

Sistema de producción de vector vírico

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

La invención se refiere a la producción de vectores víricos. Más específicamente, la presente invención se refiere a la modificación de la traducción de un nucleótido de interés que está codificado en un vector vírico, en una célula de producción del vector vírico.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La terapia génica implica en términos generales la utilización de material genético para tratar enfermedades. Incluye la suplementación de células con genes defectuosos (p.ej., las que alojan mutaciones) con copias funcionales de estos genes, la inactivación de genes que funcionan incorrectamente y la introducción de nuevos genes terapéuticos.

15

El material genético terapéutico puede incorporarse en las células diana de un huésped utilizando vectores que permitan la transferencia de ácidos nucleicos. Dichos vectores pueden dividirse en general en categorías víricas y no víricas.

20

Los virus introducen naturalmente su material genético en células diana de un huésped como parte de su ciclo de replicación. Los vectores víricos manipulados aprovechan esta capacidad para poder transportar un nucleótido de interés (NDI) hasta una célula diana. Actualmente se han manipulado varios virus como vectores para la terapia génica. Entre ellos se incluyen retrovirus, adenovirus (AdV), virus adenoasociados (VAA), virus del herpes simplex (VHS) y virus Vaccinia.

25

Además de la modificación para que porten el nucleótido de interés, los vectores víricos típicamente se manipulan adicionalmente para ser de replicación defectuosa. De esta manera, los vectores recombinantes pueden infectar directamente una célula diana pero son incapaces de producir generaciones adicionales de viriones infecciosos. Otros tipos de vectores víricos pueden ser condicionalmente competentes para la replicación dentro de las células de cáncer únicamente, y pueden codificar adicionalmente un transgén o proenzima tóxico.

30

Se han desarrollado vectores retrovíricos como terapias para diversos trastornos genéticos y actualmente están demostrando ser cada vez más prometedores en ensayo clínico (p.ej., Galy, A. y A. J. Thrasher, *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 11(6): 545-550, 2010; Porter, D. L., B. L. Levine, M. Kalos, A. Bagg y C. H. June, *N. Engl. J. Med.* 365(8): 725-733, 2011; Campocharo, P. A., *Gene Ther* 19(2): 121-126, 2012; Cartier, N., S. Hacein-Bey-Abina, C. C. Bartholomae, P. Bougneres, M. Schmidt, C. V. Kalle, A. Fischer, M. Cavazzana-Calvo y P. Aubourg, *Methods Enzymol.* 507: 187-198, 2012; Sadelain, M., I. Riviere, X. Wang, F. Boulad, S. Prockop, P. Giardina, A. Maggio, R. Galanello, F. Locatelli y E. Yannaki, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1202: 52-58, 2010; DiGiusto, D. L., A. Krishnan, L. Li, H. Li, S. Li, A. Rao, S. Mi, P. Yam, S. Stinson, M. Kalos, J. Alvarnas, S. F. Lacey, J. K. Yee, M. Li, L. Couture, D. Hsu, S. J. Forman, J. J. Rossi y J. A. Zaia, *Sci. Transl. Med.* 2(36): 36ra43, 2010, y Segura MM, M. M., Gaillet B, Garnier A., *Expert opinion in biological therapy*, 2013).

35

40

Entre los ejemplos importantes de tales vectores se incluyen el sistema de vector retrovirus gamma (basado en el VLMM), el sistema de vector lentivirus de primate (basado en VIH-1) y el sistema de vector lentivirus no de primate (basado en el virus de la anemia infecciosa equina, VAIE).

45

La genética inversa ha permitido una manipulación intensa de estos vectores basados en virus, de manera que han podido producirse vectores codificantes de secuencias heterólogas grandes (aprox. 10 kb) mediante transfección de células de mamífero con secuencias de ADN apropiadas (revisión en Bannert, K., *Caister Academic Press*: n° 347-370, 2010).

50

La manipulación y utilización de vectores víricos en la etapa de investigación típicamente implica la producción de vectores de gen informador, codificantes de, por ejemplo, GFP o lacZ. Los títulos de estos vectores clínicamente irrelevantes habitualmente están en la región de 1×10^6 a 1×10^7 unidades transductoras por ml (UT/ml) de material recolectado en bruto. La concentración y purificación adicionales de este material pueden conseguir cultivos madre de trabajo con más de 1×10^{10} UT/ml. Sin embargo, la producción de vectores codificantes de NDI terapéuticamente relevantes con frecuencia resulta en títulos sustancialmente reducidos en comparación con estos vectores informadores.

55

60

Existen varios factores que son potencialmente responsables de este efecto.

1. El tamaño del genoma terapéutico. Los retrovirus pueden empaquetar genomas muy grandes, aunque se cree que las etapas de transcripción inversa y/o integración se vuelven menos eficientes a medida que se incrementa el tamaño.

65

2. La estabilidad del ARN genómico del vector. Esta puede verse reducida por la presencia de elementos de inestabilidad no predichos en el NDI.

3. Uso subóptimo de los nucleótidos dentro del ARN genómico del vector. Los genomas de virus de tipo salvaje con frecuencia presentan un determinado sesgo nucleotídico (p.ej., VH-1 es rico en AT). Los genomas de los vectores tienden a ser menos ricos en AT, lo que puede afectar a las etapas de empaquetamiento y/o post-maduración.

4. Expresión del NDI en células de producción de vector vírico. La proteína (sobre)expresada puede presentar un efecto indirecto o directo sobre el ensamblaje y/o infectividad del virión del vector.

Los presentes inventores han demostrado empíricamente que la expresión de la proteína codificada por el NDI dentro de las células de producción de vectores víricos puede afectar adversamente a los títulos de vector terapéutico (ver las figuras 3i y 3ii).

La incorporación de una proteína codificada por el NDI (la proteína de interés, PDI) en los viriones del vector también puede impactar sobre el procesamiento posterior de las partículas de vector; por ejemplo, un NDI codificante de un PDI transmembranal puede conducir a una expresión superficial elevada de la proteína transmembranal en el virión del vector vírico, alterando potencialmente las propiedades físicas de los viriones. Además, dicha incorporación puede presentar el PDI al sistema inmunológico del paciente en el sitio de administración, que puede impactar negativamente sobre la transducción y/o la expresión a largo plazo del gen terapéutico *in vivo*. El NDI también podría inducir la producción de proteínas secundarias o metabolitos no deseables que podrían impactar sobre la producción, purificación, recuperación e inmunogenicidad y, por lo tanto, resulta deseable minimizarlo.

Existe una clara necesidad de la capacidad de reprimir la expresión de un NDI en células de producción de vector vírico, manteniendo simultáneamente una expresión eficaz del NDI en las células diana. Sea el mecanismo que se utilice, la ruta 'natural' de ensamblaje y funcionalidad resultante de las partículas de vector vírico no debe bloquearse. Lo anterior no resulta sencillo porque la molécula de genoma del vector vírico que se empaquetará en viriones debe codificar necesariamente el casete de expresión del NDI. En otras palabras, debido a que la molécula del genoma del vector y los casetes de expresión del NDI se encuentran operablemente ligados, la modificación del casete de expresión de NDI puede presentar consecuencias adversas sobre la capacidad de producir la molécula de genoma del vector en la célula. Por ejemplo, en el caso de que se utilice un bloque de transcripción física (p.ej., el sistema represor TetT) para reprimir el casete de expresión de NDI, es probable que la producción de la molécula de genoma del vector también resulte inhibida por impedimento estérico. Además, las modificaciones del mecanismo de control tampoco deben afectar adversamente a la funcionalidad de la molécula de genoma del vector tras la maduración y liberación del virión (es decir, con respecto al control de la transducción de la célula diana). Por ejemplo, la molécula de ARN genómico retrovírica debe ser capaz de los procesos de transcripción inversa e integración: cualquier modificación del casete de expresión de NDI no debe bloquear estas etapas en el proceso de transducción.

La represión de la expresión de NDI dentro de las células de producción de vector vírico puede presentar ventajas adicionales. En el caso de que la expresión de NDI conduzca a una reducción de la viabilidad de las células de producción de vector, su represión puede resultar beneficiosa para la fabricación a gran escala, que requiere un gran número de células. La reducción de los residuos celulares debido a la muerte celular también reducirá las impurezas en el material recolectado de vector en bruto. El procesamiento, purificación y concentración de la plataforma de vector (es decir, diferentes genes terapéuticos codificados en el mismo sistema de vector) podrían estandarizarse; en el caso de que únicamente los genes heterólogos expresados dentro de las células de producción de vector vírico sean los requeridos para la producción del vector, el procesamiento posterior podría optimizarse más fácilmente para una plataforma entera de vectores terapéuticos, resultando en especificaciones físicas muy similares de preparaciones de vectores. La variabilidad de la respuesta inmunológica a los vectores resultantes y la toxicidad de los mismos *in vivo* pueden minimizarse, lo que puede conducir a una expresión de NDI terapéutica más persistente en las células diana.

Los promotores específicos de tejido que limitan la expresión del NDI en las células de producción son una posible solución a este problema, aunque la debilidad de estos promotores puede conducir a niveles adversos de proteína del transgén. Sin embargo, puede conseguirse una expresión mayor y más robusta del NDI en las células diana utilizando promotores constitutivos. En efecto, dicha expresión robusta puede resultar necesaria para la eficacia *in vivo*. Además, los promotores específicos de tejido pueden ser menos predecibles al seguir un producto de vector terapéuticos por modelos animales y en seres humanos durante el desarrollo preclínico y clínico.

El documento nº WO 2000/006751 se refiere a células eucarióticas capaces de replicar vectores de expresión recombinante que producen proteínas heterólogas, en las que la célula comprende un polinucleótido codificante de una proteína represora que es capaz de reprimir la producción de la proteína heteróloga.

EXPOSICIÓN DE LA INVENCION

Tal como se ha indicado de manera general anteriormente, la expresión de una proteína de interés (PDI) codificada por el casete de expresión de vector vírico en la célula de producción de vector vírico puede presentar varios problemas para la generación de productos terapéuticos de vectores víricos. En particular, dicha expresión puede conducir a una

reducción de los títulos de vector vírico y la incorporación no deseable, o la asociación con, una proteína codificada por el NDI en la partícula de vector vírico.

5 Los presentes inventores han demostrado que este problema puede superarse mediante la utilización de un sistema de control de la traducción heterólogo en cultivos de células eucarióticas para reprimir la traducción del NDI y, de esta manera, reprimir o bloquear la expresión de la proteína codificada por el NDI. Inesperadamente, los presentes inventores han encontrado que la utilización de este sistema no bloquea la producción de moléculas empaquetables del genoma del vector ni la actividad de los viriones vectores, y no interfiere con la expresión a largo plazo del NDI en la célula diana.

10 En un aspecto, la invención proporciona un vector vírico que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que comprende un sitio de unión operablemente ligado a un nucleótido de interés, en el que el sitio de unión es capaz de interactuar con una proteína de unión a ARN, de manera que la traducción del nucleótido de interés resulta reprimida en una célula de producción del vector vírico, y en el que la proteína de unión a ARN es la proteína de atenuación de la unión a ARN del triptófano (TRAP, por sus siglas en inglés).

15 En otro aspecto, la invención proporciona un sistema de producción de vectores víricos que comprende un conjunto de secuencias de ácidos nucleicos codificantes de los componentes requeridos para la producción del vector vírico, en el que el genoma del vector comprende la secuencia de ácidos nucleicos tal como se define en la invención.

20 En otro aspecto, la invención proporciona una célula de producción de vector vírico que comprende la secuencia de ácidos nucleicos tal como se define en la invención o el sistema de producción de vectores víricos de la invención.

25 En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para producir vectores víricos, que comprende introducir la secuencia de ácidos nucleicos tal como se define en la invención o el sistema de producción de vectores víricos de la invención en una célula de producción de vector vírico y cultivar la célula de producción bajo condiciones adecuadas para la producción de los vectores víricos.

30 En otro aspecto, la invención proporciona una célula transducida por el vector vírico de la invención.

35 En otro aspecto, la invención proporciona un método para identificar los sitios de unión a ácido nucleico y las proteínas de unión a ácidos nucleicos que son capaces de interactuar de manera que la traducción de un nucleótido de interés resulta reprimida en la célula de producción de vector vírico al ligarse operablemente con el sitio de unión a ácido nucleico tal como se define en la invención, en el que el método comprende analizar la expresión de un gen informador en la célula que comprende tanto el sitio de unión a ácido nucleico operablemente ligado al gen informador y la proteína de unión a ácido nucleico.

40 En otro aspecto, la invención proporciona un método para reprimir la traducción de un nucleótido de interés (NDI) en una célula de producción de vector vírico, comprendiendo el método introducir en la célula de producción de vector vírico la secuencia de ácidos nucleicos tal como se define en la invención y una secuencia de ácidos nucleicos codificante de una proteína de unión a ARN (PUA), en la que la PUA se une al sitio de unión a PUA, reprimiendo de esta manera la traducción del NDI.

45 En otro aspecto, la invención proporciona un método para incrementar los títulos de vector vírico en una célula eucariótica de producción de vector, comprendiendo el método introducir en la célula eucariótica de producción de vector el sistema de producción de vectores víricos de la invención y una secuencia de ácidos nucleicos codificante de una proteína de unión a ARN (PUA), en la que la PUA se une al sitio de unión a PUA y reprime la traducción del NDI, incrementando de esta manera los títulos de vector vírico respecto a un vector vírico que no presenta ningún sitio de unión a PUA.

50 En otro aspecto, la exposición proporciona una secuencia de ácidos nucleicos que comprende un sitio de unión operablemente ligado a un nucleótido de interés, en el que el sitio de unión es capaz de interactuar con una proteína de unión a ARN, de manera que la traducción del nucleótido de interés resulta reprimida o bloqueada en una célula de producción del vector vírico.

55 En una realización preferente, la proteína de unión a ARN es la proteína de atenuación de la unión a ARN del triptófano (TRAP), por ejemplo la proteína de atenuación de la unión a ARN del triptófano bacteriana.

60 Otro aspecto de la exposición se refiere a un vector vírico que comprende la secuencia de ácidos nucleicos de la exposición.

Otro aspecto de la exposición se refiere a un sistema de producción de vectores víricos que comprende un conjunto de secuencias de ácidos nucleicos codificantes de los componentes requeridos para la producción del vector vírico, en el que la secuencia genómica del vector comprende la secuencia de ácidos nucleicos de la exposición.

Otro aspecto de la exposición se refiere a un constructo de ADN para la utilización en el sistema de producción de vectores víricos de la exposición, que comprende la secuencia de ácidos nucleicos de la exposición.

5 Un aspecto adicional de la exposición se refiere a un constructo de ADN para la utilización en el sistema de producción de vectores víricos de la exposición, que comprende la secuencia de ácidos nucleicos codificante de la proteína de unión a ARN de la exposición.

10 Otro aspecto de la exposición se refiere a un conjunto de constructos de ADN para la utilización en el sistema de producción de vectores víricos de la exposición, que comprende algunos o todos los constructos de ADN de la exposición y constructos de ADN codificantes de las proteínas Gag/Pol y la proteína Env, o sustitutos funcionales de las mismas. También puede utilizarse un constructo de ADN que expresa Rev en el sistema de producción de vectores víricos.

15 Otro aspecto de la exposición se refiere a una célula de producción de vector vírico que comprende la secuencia de ácidos nucleicos, el sistema de producción de vectores víricos, o algunos o todos los constructos de ADN de la exposición.

20 Otro aspecto de la exposición se refiere a un procedimiento para producir vectores víricos, que comprende introducir la secuencia de ácidos nucleicos, el sistema de producción de vectores víricos, o algunos o todos los constructos de ADN de la exposición en una célula de producción de vector vírico y cultivar la célula de producción bajo condiciones adecuadas para la producción de los vectores víricos.

25 Otro aspecto de la exposición se refiere a un vector vírico producido mediante el sistema de producción de vectores víricos de la exposición utilizando la célula de producción de vector vírico de la exposición o mediante el procedimiento de la exposición.

Otro aspecto de la exposición se refiere a una célula transducida por el vector vírico de la exposición.

30 Otro aspecto de la exposición se refiere a la secuencia de ácidos nucleicos, vector vírico o célula transducida de la exposición para la utilización en medicina.

Otro aspecto de la exposición se refiere a la utilización de la secuencia de ácidos nucleicos, vector vírico o célula transducida de la exposición en medicina.

35 Otro aspecto de la exposición se refiere a la utilización de la secuencia de ácidos nucleicos, vector vírico o las células de la exposición para la preparación de un medicamento para administrar un nucleótido de interés en un sitio diana en necesidad de los mismos.

40 Otro aspecto de la exposición se refiere a un método de tratamiento que comprende administrar la secuencia de ácidos nucleicos, vector vírico o célula transducida de la exposición en un sujeto que necesita de los mismos.

45 Otro aspecto de la exposición se refiere a una composición farmacéutica que comprende la secuencia de ácidos nucleicos, vector vírico o célula transducida de la exposición en combinación con un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Otro aspecto de la exposición se refiere a un método para identificar sitios de unión a ácido nucleico y/o proteínas de unión a ácidos nucleicos que son capaces de interactuar de manera que la traducción de un nucleótido de interés resulta reprimida o bloqueada en la célula de producción de vector vírico al ligarse operablemente con el sitio de unión a ácidos nucleicos, en el que el método comprende analizar la expresión de un gen informador en la célula que comprende tanto el sitio de unión a ácido nucleico operablemente ligado al gen informador y la proteína de unión a ácido nucleico.

55 **DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION**

Una limitación significativa de la producción de vectores retrovíricos terapéuticos a títulos elevados o incluso moderados puede ser la expresión adversa de la proteína codificada por el transgén/NDI en las células productoras, particularmente en el caso de que el transgén esté controlado por un promotor constitutivo potente. Las proteínas de determinados transgenes pueden presentar efectos variables, tanto directos como indirectos, sobre la capacidad de la célula de producir partículas de vector infeccioso activo. El metabolismo celular, el ensamblaje de las partículas de vector vírico y/o la actividad de las partículas pueden resultar afectados por una acción particular (conocida o no) del producto del transgén. Se han utilizado promotores específicos de tejido para silenciar la expresión de transgenes en las células productoras como solución a este problema, aunque una desventaja significativa de este enfoque es que con frecuencia la expresión génica a partir de los promotores específicos de tejido no es tan robusta como a partir de promotores constitutivos, y puede ser menos predecible o más variable en los diferentes modelos animales que se utilizan durante el desarrollo de los vectores.

5 Los presentes inventores han encontrado inesperadamente que la utilización nueva de una proteína de unión a ARN (p.ej., la proteína reguladora del operón *trp* bacteriano, la proteína de atenuación de la unión a ARN del triptófano, TRAP) y las dianas de ARN a las que se une, reprimirán o bloquearán la traducción del transgén dentro de una célula productora de vector vírico de ARN o ADN. En el caso de TRAP, su reducción o bloqueo de la traducción del transgén puede resultar en títulos de vector mejorados para los vectores codificantes de determinados NDI en un factor de hasta 100 veces. Este sistema se denomina sistema de células productoras de represión del transgén en el vector o sistema TRIP (por sus siglas en inglés).

10 Los presentes inventores demuestran por primera vez que la utilización de un sistema represor de la traducción bacteriano incrementan los títulos de vector de ARN (retrovírico) en los sistemas productores de células eucarióticas mediante la represión de la traducción del ARNm del NDI. La introducción de un sitio de unión para una proteína de unión a ARN (p.ej., una secuencia de unión a TRAP, tbs) cadena arriba del codón de inicio de la traducción del NDI permite la represión específica de la traducción del ARNm derivado del casete de expresión interno, no presentando

15 ningún efecto perjudicial sobre la producción o estabilidad del vector de ARN. Los presentes inventores también han demostrado que la producción y funcionamiento de los vectores retrovíricos aparentemente resulta afectado mínimamente por la presencia de tbs en el genoma del vector. Lo anterior implica que la transcripción inversa (RT, por sus siglas en inglés) puede desplazar a TRAP del tbs o que TRAP no se une eficientemente al tbs en el contexto del largo ARN genómico del vector empaquetado dentro del virión. Los presentes inventores también han demostrado que una configuración similar de tbs introducido dentro del casete de expresión de NDI de los vectores víricos de ADN, tales como VAA, permite la represión de la traducción del NDI por TRAP, manteniendo simultáneamente la producción de viriones activos de vector vírico.

20 El número de nucleótidos entre la tbs y el codón de inicio de la traducción del NDI puede variarse preferentemente entre 0 y 12 nucleótidos sin afectar al grado de represión de la traducción del ARNm. Aunque sin deseo de restringirse a ninguna teoría, la TRAP unida a tbs puede estar reprimiendo el inicio de la traducción mediante el bloqueo físico del complejo ribosómico de escaneo 40S antes de que alcance el codón de inicio, a raíz de lo cual se habría formado una maquinaria de traducción más estable y de afinidad más elevada.

25 Además, los presentes inventores han encontrado que la tbs puede introducirse cadena abajo de un sitio interno de entrada ribosómica (IRES, por sus siglas en inglés), reprimiendo la traducción del NDI en un ARNm multicistónico. En efecto, lo anterior proporciona evidencia adicional de que TRAP unido a tbs podría bloquear el paso del ribosoma 40S; los elementos IRES funcionan secuestrando la subunidad ribosómica 40S en un ARNm de una manera independiente de CAP antes de que se forme el complejo de traducción completo (ver Thompson, S., Trends in

30 Microbiology 20(11): 558-566, 2012) para una revisión sobre el inicio de traducción en IRES). La secuencia tbs introducida entre el IRES y el codón de inicio del NDI presentó un ligero impacto sobre los niveles de traducción no reprimida pero mantuvo la capacidad de recibir la actividad funcional de TRAP. Este resultado demuestra que resulta posible para el sistema TRIP la represión de múltiples marcos de lectura abierta a partir de un único ARNm expresado a partir de genomas de vector vírico. Esta será una característica útil del sistema TRIP durante la producción de vectores codificantes de múltiples genes terapéuticos, especialmente en el caso de que todos los productos del transgén puedan afectar negativamente a los títulos de vector en algún grado.

35 La caracterización adicional de la secuencia tbs ha revelado que, para TRAP como proteína de unión al ARN, preferentemente el sistema TRIP funciona al nivel máximo con una secuencia tbs que contenga por lo menos 8 repeticiones de RAGNN, aunque en una realización, pueden utilizarse 7 repeticiones para obtener de todas maneras una represión robusta del transgén, y en otra realización, pueden utilizarse 6 repeticiones para permitir una represión suficiente del transgén hasta niveles que podrían rescatar los títulos de vector. Aunque la secuencia de consenso RAGN puede modificarse para mantener la represión mediada por TRAP, preferentemente puede optimizarse la secuencia precisa seleccionada a fin de garantizar niveles elevados de traducción en el estado no reprimido. Por ejemplo, las secuencias tbs pueden optimizarse eliminando sitios de corte y empalme, secuencias inestables o tallos-bucle que pueden perjudicar la eficiencia de traducción del ARNm en ausencia de TRAP (es decir, en células diana). Con respecto a la configuración de las repeticiones de RAGNN de un tbs dado, el número de nucleótidos "espaciadores" N entre las repeticiones de RAG es preferentemente de dos. Sin embargo, un tbs que contenga más de dos espaciadores N entre por lo menos dos repeticiones de RAG puede resultar tolerado (hasta 50% de las repeticiones que contienen tres N pueden resultar en un tbs funcional según se evalúa en estudios de unión *in vitro*; Babitzke P, Y. J., Campanelli D., Journal of Bacteriology 178(17): 5159-5163, 1996). En efecto, los presentes inventores han demostrado que una secuencia tbs 11x RAGNN puede tolerar hasta tres sustituciones con repeticiones de RAGNNN y seguir conservando cierta actividad de bloqueo de la traducción potencialmente útil en colaboración con la unión de TRAP.

45 El marco de lectura abierta de la proteína de unión a ARN (p.ej., TRAP) puede optimizarse para sus codones para la expresión en células de mamífero (p.ej., de *Homo sapiens*), ya que la secuencia génica bacteriana probablemente no resulta óptima para la expresión en células de mamífero. La secuencia también puede optimizarse eliminando potenciales secuencias inestables y sitios de corte y empalme. La utilización de una etiqueta HIS expresada C-

50

55

60

65

terminalmente en la proteína TRAP aparentemente ofrece un beneficio en términos de represión de la traducción y puede utilizarse opcionalmente. Esta etiqueta HIS C-terminal puede mejorar la solubilidad o estabilidad de TRAP dentro de las células eucarióticas, aunque no puede excluirse un beneficio funcional mejorado. Sin embargo, TRAP tanto etiquetado con HIS como no etiquetado permite una represión robusta de la expresión del transgén. Determinadas secuencias de acción en *cis* dentro de la unidad de transcripción de la proteína de unión a ARN (p.ej., TRAP) también pueden optimizarse; por ejemplo, los constructos controlados por el promotor EF1a permiten una mejor represión con bajas adiciones de plásmido de TRAP en comparación con los constructos controlados por promotor del CMV en el contexto de la transfección transitoria.

La expresión robusta de la proteína de unión a ARN (p.ej., TRAP) dentro del sistema TRIP resulta deseable para maximizar la represión de la traducción del transgén. Se espera que el requisito de incluir niveles elevados del plásmido de proteína de unión a ARN podría afectar negativamente a la transfección de los demás constructos de producción de vector en un sistema de producción transitoria de vectores. Lo anterior se debe a que la cantidad/proporción de constructo genómico típicamente se optimiza en ausencia de los plásmidos adicionales; un requisito para cotransfectar grandes cantidades de plásmido codificante de proteína de unión a ARN podría afectar negativamente a estas proporciones óptimas, llevando a títulos reducidos de vector. Sin embargo, se ha demostrado que una proporción de TRAP a plásmido de genoma de vector retroviral de tan sólo 1 a 10 permite niveles prácticamente máximos de represión del transgén durante la utilización de un protocolo de transfección transitoria. Además, se produjo un vector que expresaba un NDI no problemático a títulos prácticamente máximos al utilizar una proporción de TRAP-a-plásmido de genoma de vector retroviral de hasta 1 a 5. Por lo tanto, la adición del plásmido de expresión de TRAP a estas cantidades de entrada relativamente bajas durante la transfección transitoria de los constructos de producción de vector retroviral no es probable que afecte negativamente proporciones anteriormente optimizadas de dichos constructos. Las proporciones de plásmido expresante de TRAP a plásmidos de componente vector vírico de ADN, tal como VAA, también han sido optimizadas.

Estos importantes resultados demuestran que puede utilizarse el sistema TRIP durante los protocolos de producción de vector de transfección transitoria. El sistema TRIP también puede utilizarse para sistemas de producción estable y, por lo tanto, es ampliamente aplicable a la producción de vectores víricos.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1. Esquema de muestra los componentes de vector retroviral típicos. Los sistemas de vector terapéutico terapéuticos utilizados actualmente han sido altamente manipulados a partir de los genomas del virus de tipo salvaje del que se derivan. Los vectores retrovirales gamma se producen típicamente utilizando sistemas de 3 o 4 componentes que requieren el genoma del vector, Gag/Pol y constructos de expresión de la cubierta y, para los vectores lentivirales basados en el VIH, también se requiere el gen accesorio Rev. Los vectores lentivirales basados en el VAIE (virus de la anemia infecciosa equina) no requieren Rev si un marco de lectura abierta (ORF, por sus siglas en inglés) sustituye a RRE. Los genomas de vector típicamente requieren una señal de empaquetamiento (opcionalmente), un elemento post-transcripcional (EPR), el 3'ppu y un LTR autoinactivador (SIN, por sus siglas en inglés). Las regiones R-U5 resultan necesarias para la correcta poliadenilación de tanto el ARN genómico del vector como el ARNm del transgén, así como para el procedimiento de transcripción inversa. Habitualmente, los promotores tanto 'externos' como 'internos' (Pro) codificados dentro del casete genómico son promotores fuertes eucarióticos o víricos, al igual que los que controlan los demás componentes del sistema de vector.

Figura 2. Esquema que describe un experimento de mezcla de plásmido genómico de vector para determinar la magnitud del impacto negativo de un producto de transgén NDI sobre la capacidad de las células productoras de producir vectores. En un experimento de mezcla de genoma de vector, se produjeron partículas de vector mediante cotransfección de células con componentes de empaquetamiento de vector y dos tipos de plásmidos de genoma de vector: un plásmido de genoma de vector de gen informador y un vector codificante de un transgén NDI, a fin de someter a ensayo el impacto del producto del transgén sobre la productividad de vector de la célula. Debido a que la expresión de las proteínas informadoras lacZ o GFP no impacta sobre los títulos de vector, se utilizan estos como vectores de control. La introducción del segundo plásmido de genoma de vector codificante de un transgén NDI que puede impactar negativamente sobre la productividad de vector de la célula presentará un efecto 'espectador' sobre la producción del vector de lacZ. La expresión del transgén NDI puede producirse principalmente a partir del casete de expresión interno, que típicamente está controlado por un promotor constitutivo potente. Debido a los posibles resultados del empaquetamiento de dos copias de las moléculas de ARN genómico del vector en cada virión y el hecho de que sólo un ARN de vector se transcriba inversamente y se integre en las células diana, se producirá un efecto de dilución de la mezcla del segundo genoma con el vector de lacZ; este efecto de dilución se pone más de manifiesto al mezclar proporcionalmente más del segundo plásmido de genoma con el plásmido de genoma del vector de lacZ. En consecuencia, se requiere un control de 'dilución' en el que el segundo plásmido de genoma de vector es el de GFP; también es conocido que GFP no presenta ningún efecto negativo sobre los títulos de vector. Por lo tanto, el impacto de un producto de transgén NDI dado sobre la productividad del vector puede medirse frente al control de mezcla de LacZ:genoma de vector de GFP. Los vectores producidos en el experimento de mezcla típicamente se titulan mediante una lectura para el vector de lacZ, p.ej., la tinción con X-gal de las células transducidas con vector.

Figura 3i. La mezcla de genoma del vector durante la producción demuestra el impacto de la expresión de la proteína del transgén sobre los títulos de vector.

Se mezcló un componente genómico de vector codificante de lacZ en una proporción 1:1 o 1:5 con otro genoma de vector durante la producción de vector transitoria y se sometió a ensayo el impacto sobre el título de vector mediante ensayo de X-Gal de las células diana. La expresión de GFP no impactó sobre los títulos de vector y por lo tanto el nivel de reducción del título a diferentes proporciones indica el efecto de línea base de dilución del genoma de lacZ. Por lo tanto, puede medirse el impacto de otros transgenes del vector sobre los títulos de lacZ frente a las mezclas de lacZ:GFP.

B. Este experimento indica que el efecto de la proteína del transgén de RetinoStat®, StarGen™, UshStat® y ReQuinate® impacta sobre los títulos de vector en un factor de 7 a 100. Los elementos de promotor externos e internos son ambos del CMV.

Figura 3ii. La mezcla de genomas de COX-2 y/o FPR y lacZ durante la producción demuestra el impacto de la expresión de la proteína del transgén sobre los títulos de vector. Se mezcló un componente genómico de vector codificante de lacZ en una proporción 1:1 o 1:5 con GFP o un genoma de vector terapéutico durante la producción de vector transitoria y se sometió a ensayo el impacto sobre el título de vector de lacZ mediante ensayo con X-Gal de las células diana. La expresión de GFP no impactó sobre los títulos de vector y por lo tanto el título de lacZ indica el efecto de línea base de dilución del genoma de lacZ. Por lo tanto, puede medirse el impacto de otros transgenes del vector sobre los títulos de lacZ puede medirse frente a las mezclas de lacZ:GFP en las proporciones 1:1 y 1:5. Los vectores terapéuticos sometidos a ensayo eran vectores de transgén único o vectores bicistronicos que alojaban un elemento IRES; el efecto de COX-2 y FPR sobre los títulos de lacZ podría ser aditivo.

Figura 4. Un ejemplo del sistema TRIP en la represión de la expresión del transgén en células de producción de vector retroviral. Una célula de producción de vector retroviral que expresa TRAP o TRAP de codones optimizados (coTRAP) en donde se inserta tbs en el 5'UTR del transgén del casete de expresión del genoma del vector. TRAP se une a tbs y bloquea la traducción de la proteína del transgén. Las moléculas de ARN del vector también son capaces de unirse a TRAP, aunque inesperadamente ello no bloquea el ciclo vital de una ronda del virión del vector, es decir, las etapas de transcripción inversa e integración las realiza normalmente la partícula del vector.

Figura 5. Las limitaciones de utilizar únicamente el número de células positivas para GFP o la mediana de la intensidad de fluorescencia (MIF) en el análisis de citometría de flujo de las poblaciones celulares transfectadas con plásmido con GFP. Estos esquemas muestran los potenciales resultados en experimentos de comparación de poblaciones con niveles de expresión de GFP sustancialmente diferentes. En el experimento A/B, ambas poblaciones positivas para GFP presentan la misma IMF y en el experimento C/D, las poblaciones positivas para GFP contienen un número similar de células pero IMF diferentes en un factor de 10. El escenario A se ha demostrado en la práctica al utilizar un pEF1a-coTRAP[H6]: un número muy pequeño (<1%) de células HEK293T positivas para GFP de expresión muy elevada se ha observado consistentemente al cotransfectarlas con pCMV-tbsGFP y pEF1a-coTRAP[H6], sugiriendo que el promotor EF1a podría no encontrarse activo en esta pequeña subpoblación. Por lo tanto, ello sesga el análisis de la represión de GFP al utilizar únicamente la IMF como medida de la expresión en la población. De esta manera, la puntuación de expresión (% de positivas para GFP x IMF) describe más eficazmente el nivel global de expresión de proteína GFP dentro de la población seleccionada.

Figura 6. Constructos de gen informador fluorescente para la evaluación de la configuración TRAP/tbs. Se generó pCMV-tbsGFP inicialmente a partir de pONY8.4RC-GFP para una evaluación simple. A continuación, se generó el genoma de vector VAIE SIN pONY8.4RC-tbsGFP para evaluar el efecto de la configuración de TRAP/tbs sobre la actividad del vector. La secuencia de tbs [RAGNN]₁₁ utilizada inicialmente para la evaluación estaba flanqueada por secuencias de 41 nt proximales y 9 nt distales delante del codón de inicio de la traducción.

Figura 7. Plásmidos de expresión de TRAP utilizados en estudios de evaluación de la transfección transitoria y para preparar líneas celulares HEK293T-TRAP[H6] estables. Los experimentos iniciales utilizaron el esqueleto pCI-Neo para controlar la expresión de TRAP de codones/secuencia optimizados de *Bacillus subtilis* más/menos una etiqueta de HIS₆ C-terminal. A continuación, se utilizó la secuencia del promotor EF1a para sustituir el promotor de CMV, rindiendo pEF1a-coTRAP[H6]. Se produjo el plásmido pEF1a-coTRAP mediante sustitución del adaptador oligo de la secuencia H6 en pEF1a-coTRAP[H6] de manera que las 3'UTR de ambos constructos controlados por el promotor EF1a fueran idénticos, en contraste con los constructos controlados por el promotor del CMV, en los que las 3'UTRs son diferentes. Se re-derivó totalmente pEF1a-coTRAP-iBsr mediante síntesis y expresaba un ARNm multicistricón codificante de TRAP[H6] y un marcador de resistencia a la blasticidina; se utilizó el IRES del virus de la endomiocarditis (VEMC) para controlar la traducción de Bsr.

Figura 8. Fotografías seleccionadas del primer estudio de evaluación de la transfección transitoria de la represión mediada por TRAP de la expresión del transgén en células HEK293T. Evidencia fotográfica que muestra la capacidad de pCI-coTRAP[H6] de reprimir la expresión específicamente a partir de 5'UTR que contiene tbs del pCMV-tbsGFP.

Figura 9. Resumen de los datos de citometría de flujo del primer estudio de evaluación de la transfección transitoria de la represión mediada por TRAP de la expresión del transgén en células HEK293T.

A. Histograma del % de la población positiva para GFP y de la mediana de la intensidad de fluorescencia (ArbU) representados gráficamente en ejes diferentes. Ni TRAP ni TRAP[H6] presentó ningún impacto sobre la expresión de GFP a partir de pCMV-GFP. TRAP[H6] redujo significativamente la expresión de GFP a partir de pCMV-tbsGFP en una proporción de 1:1 y de una manera dependiente de la dosis. TRAP aparentemente era menos capaz de reprimir la expresión a partir de pCMV-tbsGFP.

B. Las puntuaciones de expresión se obtuvieron para cada cultivo celular cotransfectado con el fin de evaluar mejor la magnitud de la expresión mediada por TRAP. La multiplicación del % de células positivas por la IMF proporciona una aproximación de la cantidad total de GFP producido por cultivo. El nivel más elevado de represión de GFP por TRAP[H6] según las Puntuaciones de expresión fue de ~25 veces en el presente experimento.

C. Gráficos de puntos de citometría de flujo representativos de plásmidos informadores cotransfectados con pCI-coTRAP o pCI-coTRAP[H6] en una proporción 1:1.

D. Mediana de intensidad de fluorescencia de GFP de células HEK293T cotransfectadas con plásmidos con GFP informador y promotor EF1a o plásmidos TRAP[H6] controlados por promotor del CMV respecto al plásmido sin expresión de TRAP (relleno). Resultó posible una represión prácticamente máxima de GFP a partir de pCMV-tbsGFP utilizando pEF1a-coTRAP[H6] en una proporción molar 1:0,1 de plásmido GFP:TRAP, que no resultó posible con pCI-coTRAP[H6].

Figura 10. Comparación funcional de TRAP con etiqueta HIS₆ y TRAP no etiquetado.

A. Histograma del % de la población positiva para GFP y de la mediana de la intensidad de fluorescencia (ArbU) representados gráficamente en ejes diferentes. Se cotransfectó un plásmido de expresión de TRAP etiquetado con HIS₆ o no etiquetado o plásmido de relleno junto con los plásmidos de informador GFP en las proporciones indicadas (entre paréntesis) por triplicado. Las células transfectadas se analizaron mediante citometría de flujo.

B. Las puntuaciones de expresión (IMF x % GFP) proporcionan una estimación global del efecto de la represión mediada por TRAP de GFP en la población. La etiqueta HIS₆ C-terminal proporciona un incremento mínimo de 2 veces de la capacidad de TRAP de reprimir la expresión de GFP por pCMV-tbsGFP.

Figura 11. Capacidad de diferentes homólogos de TRAP de reprimir la expresión del transgén y evaluación de líneas celulares HEK293T-TRAP.

A. Los ORF de TRAP de *Desulfotomaculum hydrothermale* y *Aminomonas paucivorans* se optimizaron para sus codones/secuencia y se clonaron en el esqueleto de plásmido pEF1a. Se cotransfectó un plásmido de expresión de TRAP o un plásmido de relleno junto con los plásmidos de informador GFP en las proporciones indicadas (entre paréntesis) por triplicado. Las células transfectadas se analizaron mediante citometría de flujo. Se generaron puntuaciones de expresión medias para cada condición de transfección.

B. Se compararon cuatro líneas celulares HEK293T-TRAP[H6] para su capacidad de reprimir la expresión del transgén a partir de pCMV-tbsGFP mediante transfección transitoria por triplicado. Se cotransfectó pCMV-GFP o pCMV-tbsGFP con plásmido de relleno o pEF1a-coTRAP[H6]. Las células se analizaron mediante citometría de flujo y se generaron Puntuaciones de expresión medias para cada condición. Se generó un factor medio de represión mediante la división de las Puntuaciones de expresión de pCMV-GFP/relleno por las Puntuaciones de expresión de las demás condiciones.

Figura 12. Resumen de los datos de citometría de flujo de la evaluación del sistema de TRAP-tbs de producción de vectores retrovéricos.

A. Histograma del % de la población positiva para GFP y de la mediana de la intensidad de fluorescencia (ArbU) representados gráficamente en ejes diferentes. El plásmido de expresión TRAP[H6] se cotransfectó en células HEK293T con los plásmidos de informador GFP individual o los plásmidos de genoma de vector VAIE no SIN (ver la figura 6) en las proporciones indicadas. Se consiguió la producción de vector mediante la cotransfección adicional de plásmidos de expresión de Gag/Pol y VEVG con los plásmidos de genoma de vector VAIE no SIN. La represión de GFP durante la producción del vector era muy similar a la del contexto de informador GFP individual y era dependiente de la presencia de tanto TRAP como la secuencia de tbs.

B. Las puntuaciones de expresión (IMF x % GFP) proporcionan una estimación global del efecto de la represión mediada por TRAP de GFP en la población.

C. Títulos de vector en células D17. Se generaron sobrenadantes de vector a partir de la transfección con vector pONY8.4RC-(tbs)GFP para transducir células D17 y se llevó a cabo citometría de flujo 4 días después. La configuración TRAP/tbs inesperadamente presentó un impacto mínimo sobre los títulos de vector, indicando que el ciclo vital de una sola ronda de las partículas de vector no resultaba afectado por la putativa interacción TRAP/tbs en el genoma de ARN del vector.

Figura 13. Resumen de los datos de citometría de flujo de ensayos de requisitos de espaciado corto entre tbs y el codón AUG del transgén en la configuración TRAP/tbs.

A. Esquema que muestra las variantes de espaciado sometidas a ensayo en el genoma de vector basado en pONY8.4RC-tbsGFP. La variante 'Null' presentaba un codón AUG sustituido por un codón de parada para controlar cualquier expresión de GFP que podría derivarse del ARN genómico del vector de longitud completa, es decir, controlada por el promotor del CMV 'externo' (ver la figura 6). La secuencia del tallo-bucle (TB) 5' se obtuvo a partir de la secuencia de líder del operón trp en *Bacillus subtilis*. Los nucleótidos subrayados indican la secuencia de Kozak. Estos plásmidos informadores de vector variante de espaciador se cotransfectaron en células HEK293T con plásmido de relleno o pEF1a-coTRAP[H6] en la proporción molar indicada (entre paréntesis) por triplicado. Las células se analizaron mediante citometría de flujo.

B. La expresión de GFP global para cada condición se evaluó mediante la generación de Puntuaciones de expresión medias. La eficiencia de la represión de GFP era esencialmente igual para las variantes de espaciado +11 a +1. La variante '0' aparentemente era ligeramente defectuosa para la expresión de GFP en ausencia de TRAP[H6]. Inesperadamente, la variante 5'SL era totalmente no respondedora de la represión mediada por TRAP, sugiriendo que 5'SL altera la interacción TRAP-tbs en este sistema.

Figura 14i. La definición del número mínimo de repeticiones de RAGNN en la secuencia de unión a TRAP resulta necesaria para que la configuración TRAP/tbs funcione.

A. Se clonaron las secuencias variantes de tbs en pCMV-tbsGFP para la evaluación. La secuencia de tbs inicial evaluada en el estudio se optimizó entre la repetición de RAGNN 10^a a 11^a, alterando un espaciador TG por AA. Por lo tanto, se diseñaron las variantes tbsx11M y tbsx10M de manera que se eliminase un potencial sitio SD críptico. Las repeticiones de RAGNN se delecionaron en serie desde el extremo 3' de la variante tbsx11M (de 11 a sólo 4 repeticiones), manteniendo simultáneamente el contexto de buena traducción del informador GFP. Estos plásmidos informadores de variante de espaciador de tbs-informador GFP se cotransfectaron en células HEK293T con plásmido de relleno o pEF1a-coTRAP[H6] en una proporción 10:1 de plásmidos GFP:TRAP por triplicado. Las células se analizaron mediante citometría de flujo.

B. Histograma del % de la población positiva para GFP y de la mediana de la intensidad de fluorescencia (ArbU) representados gráficamente en ejes diferentes.

C. Las puntuaciones de expresión medias para cada condición se calcularon y se utilizaron como medida de la expresión global de GFP en las poblaciones transfectadas.

D. Los factores de represión se generaron dividiendo las Puntuaciones de expresión para cada variante de tbs transfectada con plásmido de relleno por las de la transfección de pEF1a-coTRAP[H6]. La represión máxima resulta posible con 8 repeticiones de RAGNN y tbs con 7 repeticiones de RAGNN permitió una represión prácticamente máxima. La tbs con 6 repeticiones de RAGNN permitió un nivel intermedio de represión del transgén, mientras que las secuencias tbs con 5 y 4 repeticiones de RAGNN presentaban una funcionalidad mínima.

Figura 14ii. Evaluación de la funcionalidad de las secuencias tbs con una o más repeticiones de RAGNN en un fondo de tbs con 11 repeticiones de RAGNN.

A. La secuencia tbs x tbs 11M, a la que se hace referencia como N₂x11 en el presente experimento, se utilizó como la base para la modificación con progresivamente más repeticiones RAGNN desde el centro de tbs. De esta manera, las variantes contenían progresivamente 1, 3, 5, 7 o 10 repeticiones de RAGNN (los nucleótidos 3'-terminales no cuentan como espaciadores, por lo que N₃x11 contiene 10 nucleótidos espaciadores NNN). Estas variantes de tbs se clonaron en el plásmido de genoma de vector terapéutico pONYK-tbsCOX2 (ver la figura 18i), sustituyendo la secuencia tbs existente.

B. Estos plásmidos de genoma de vector que contienen variante de tbs fueron utilizados para producir un vector mediante cotransfección con componentes de empaquetamiento del vector VAIE y con plásmido de relleno o pEF1a-coTRAP[H6] en una proporción 5:1 de genoma de vector:plásmido de TRAP. Se llevó a cabo una inmunotransferencia a COX-2 en lisados celulares de las células de final de producción.

Figura 14iii. Evaluación de la funcionalidad de las secuencias tbs con una o más repeticiones de RAGNN en un fondo de tbs con 11 repeticiones de RAGNN. Niveles de proteína COX-2 en células de producción de vector 8 horas después de la transfección. Anteriormente, se habían analizado los niveles de COX2 en las células de final de producción (~48 horas después de la transfección) (ver la figura 14iiB). Con el fin de someter a ensayo si la represión mediada por TRAP-tbs difería temporalmente durante la producción del vector, se analizaron las células de producción 8 horas después de la transfección para los niveles de COX2 mediante inmunotransferencia. El patrón de expresión de COX2 de los diferentes constructos codificantes de las variantes de tbs N₃N₂ era el mismo que 8 horas después de la transfección e igual al observado ~48 horas después de la transfección (figura 14iiB). Ello indica que el grado de represión de TRAP en una secuencia tbs dada no cambia apreciablemente durante la producción del vector.

Figura 14iv. Evaluación de la funcionalidad de las secuencias tbs con una o más repeticiones de RAGNN en un fondo de tbs con 11 repeticiones de RAGNN: títulos de vector. Los sobrenadantes de vector en bruto generados a partir de las células productoras de VAIE-tbsCOX2 en experimentos asociados a la figura 14ii y figura 14iii, se titularon mediante ensayo de integración del ADN para determinar el impacto de la represión de COX2 durante la producción sobre la actividad del vector. Los datos indican que sólo se requiere una represión modesta de COX2 durante la producción (ver N₃N₂x11[3] en las figuras 14iiB y 14iii) para potenciar sustancialmente el título del vector VAIE-COX2.

Figura 14v. Evaluación de la funcionalidad de las secuencias tbs con una o más repeticiones de RAGNN en un fondo de tbs con x7 y x8 repeticiones de RAGNN.

A. Los datos anteriores indican que pueden producirse niveles máximos o prácticamente máximos de transgén utilizando tbs que comprende 8 o 7 repeticiones de RAGNN. Se insertó una única repetición de RAGNN en tbs 8xRAGNN y 7xRAGNN para evaluar el impacto sobre la función de estas secuencias de tbs más cortas. Se compararon estas junto con tbs que contenía RAGNN que comprendía x11, x7, x6 y x5 repeticiones. Estas variantes de tbs se clonaron en el plásmido de genoma de vector terapéutico pONYK-tbsCOX2 (ver la figura 18i), sustituyendo la secuencia tbs existente.

B. Estos plásmidos de genoma de vector que contenían variante de tbs fueron utilizados para producir un vector mediante cotransfección con componentes de empaquetamiento del vector VAIE y con plásmido de relleno o con pEF1a-coTRAP[H6] en una proporción 5:1 de genoma de vector:plásmido de TRAP. Se llevó a cabo la inmunotransferencia a COX-2 de lisados celulares en las primeras etapas de la producción del vector (es decir, ~8 horas después de la transfección). Los datos muestran que puede "tolerarse" una repetición RAGNN dentro de un tbs x8 repeticiones que comprende 7xRAGNN.

Figura 15. Construcción de plásmidos informadores IRES-tbs-informador GFP para someter a ensayo la regulación de TRAP/tbs dependiente de IRES de la expresión génica.

A. Se generaron constructos de IRES-tbs-informador GFP de manera que la expresión desde el cistrón distal (GFP) informase del grado de represión por TRAP. La distancia entre el elemento IRES y tbs en pCMV-Vi-tbsx11G era de 44 nt (nucleótidos espaciadores codificantes), mientras que esta distancia se reducía a 4 nt en pCMV-Vi-tbsx4G. Se clonó pCMV-ViGFP a modo de control 'sin tbs'.

B. Estos plásmidos de IRES-tbs-informador GFP se cotransfectaron en células HEK293T con plásmido de relleno o pEF1a-coTRAP[H6] en una proporción 10:1 de informador GFP:plásmido de TRAP por triplicado. Los plásmidos de ORF único-informador GFP se incluyeron en paralelo a modo de control de la represión mediada por TRAP. Las células se analizaron mediante citometría de flujo. Las puntuaciones de expresión medias para cada condición se calcularon y se utilizaron como medida de la expresión global de GFP en las poblaciones transfectadas. TRAP era capaz de reprimir la expresión de GFP dirigida desde un IRES a una magnitud similar a la expresión mediada por 5'CAP.

Figura 16. Producción de vector VAIE SIN que contenía WPRE utilizando el sistema TRIP. El plásmido de genoma vírico pONY8.9RC-tbsGFP(+WPRE) se sometió a ensayo para cualquier impacto de WPRE sobre la configuración TRAP/tbs. Las células se analizaron mediante citometría de flujo. Se generaron puntuaciones de expresión para las poblaciones celulares cotransfectadas con los genomas de vector pONY8.4RC-tbsGFP o pONY8.9RC-tbsGFP(+WPRE) junto con pEF1a-coTRAP[H6] o plásmido de relleno. Se obtuvieron las puntuaciones a partir de la multiplicación del % de GFP y los valores de la mediana de intensidad de la fluorescencia, proporcionando una medida de la expresión de GFP en la población total.

Figura 17i. Esquema de los genomas de vector terapéutico basados en ReQuinate® modificado para contener tbs. ReQuinate®, un vector para el tratamiento de la hemofilia A, codifica el gen del factor VIII humano. Es conocido que el Factor VIII bloquea la incorporación de VEV-G en la partícula del virión del vector, reduciendo drásticamente la actividad del vector. Se clonó tbs o tbs reorganizado, en el genoma del vector a fin de generar los vectores ReQuinate-tbs y ReQuinate-co, respectivamente.

Figura 17ii. Títulos ReQuinate® mejorados utilizando el sistema TRIP. Los vectores basados en ReQuinate® bajo un protocolo de vector estándar utilizando el sistema TRIP en células HEK293T: se cotransfectaron plásmidos de genoma del vector con pEF1a-coTRAP[H6] en una proporción 5:1, junto con componentes de empaquetamiento del vector VAIE. El sobrenadante de vector se recolectó y se tituló mediante ensayo de integración, y además se concentró ~70- veces mediante centrifugación, seguido del ensayo PERT y después se inmunotransfirió a VEV-G y p26 (cápside de VAIE).

A. Se potenciaron los títulos de vector ReQuinate®-tbs 30 veces respecto a ReQuinate® estimado a partir del ensayo de integración de ADN, y ello era dependiente de la presencia de TRAP durante la producción de vector. También se mejoraron las proporciones de partículas a infectividad (datos no mostrados).

B. Inmunotransferencia de VEV-G en muestras de vector concentradas. Los títulos de vector se correlacionaban con el grado de incorporación de VEV-G en los viriones de vector; es conocido que el Factor VIII_h inhibe drásticamente la cantidad de VEV-G incorporada en los viriones de vector retroviral.

C. La inmunotransferencia de núcleos de vector (p26 - cápside) demuestra que se cargó en cada pocillo un mismo número de viriones de vector.

Figura 18i. Esquema de genomas de vector codificantes de COX2 o FPR. Se clonó la variante tbsx11M en los vectores de expresión de un solo gen. Observar que las secuencias 5'UTR +/- tbsx11M son enteramente diferentes, en contraste con las 5'UTR que contenían tbs reorganizado de control utilizadas en el estudio de ReQuinate®.

Figura 18ii. Títulos de vector de COX2 de un solo gen mejorados utilizando el sistema TRIP. Los vectores basados en COX-2 de un solo gen se produjeron utilizando el sistema TRIP en células HEK293T: se cotransfectaron plásmidos de genoma del vector con pEF1a-coTRAP[H6] en una proporción 5:1, junto con componentes de empaquetamiento del vector VAIE. Se recolectó sobrenadante de vector y se tituló mediante ensayo de integración utilizando volúmenes iguales de sobrenadantes de recolección en bruto y lisados celulares de final de producción sondeados con anticuerpos anti-COX-2 en una membrana de inmunotransferencia. También se analizaron las células de ensayo de final de integración (es decir, las transducidas con preparaciones de vector de COX-2) para la expresión de COX-2 mediante inmunotransferencia.

A. Se potenciaron los títulos de vector de COX-2 100 veces estimados a partir del ensayo de integración de ADN, y ello era dependiente de la presencia de TRAP y tbs durante la producción de vector.

B. La inmunotransferencia de COX-2 en células de final de producción indica que el título de vector se correlaciona inversamente con los niveles de COX-2.

C. El incremento de las partículas de vector activas por volumen de sobrenadante recolectado resultó en un incremento de la transducción y expresión de COX-2 en las células diana.

Figura 18iii. Títulos de vector de FPR de un solo gen mejorados utilizando el sistema TRIP. Los vectores basados en FPR de un solo gen se produjeron utilizando el sistema TRIP en células HEK293T: se cotransfectaron plásmidos de genoma del vector con pEF1a-coTRAP[H6] en una proporción 5:1, junto con componentes de empaquetamiento del vector VAIE. Se recolectó el sobrenadante de vector y se tituló mediante ensayo de integración utilizando volúmenes iguales de sobrenadantes de recolección en bruto. Se potenciaron los títulos de vector de FPR 24 veces estimados a partir del ensayo de integración de ADN, y ello era dependiente de la presencia de TRAP y tbs durante la producción de vector.

Figura 19i. Esquema de genomas de vector codificantes de ORF de COX2 o FPR. Se clonó la variante tbsx11M en los plásmidos de genoma de vector multicistónico tal como se indica. Se introdujo COX-2 y FPR en posiciones de cadena arriba o de cadena abajo y se insertó la secuencia tbsx11M en ambas posiciones o ninguna de las posiciones.

Figura 19ii. Títulos de vector de COX2/FPR multicistónico mejorado utilizando el sistema TRIP. Los vectores multicistónicos en la figura 19i se produjeron utilizando el sistema TRIP en células HEK293T: se cotransfectaron plásmidos de genoma del vector con pEF1a-coTRAP[H6] en una proporción 5:1, junto con componentes de empaquetamiento del vector VAIE. Se recolectó sobrenadante de vector y se tituló mediante ensayo de integración utilizando volúmenes iguales de sobrenadantes de recolección en bruto y lisados celulares de final de producción

sondeados con anticuerpos anti-COX-2 en una membrana de inmunotransferencia. Se potenciaron ~100 veces los títulos de vector de COX-2/FPR multicistrónico y se potenciaron ~50 veces los títulos de vector de FPR/COX-2 multicistrónico estimados mediante el ensayo de integración de ADN, y ello era dependiente de la presencia de TRAP y tbs durante la producción de vector. La inmunotransferencia de COX-2 en las células de final de producción indica que el título de vector se correlaciona inversamente con los niveles de COX-2 y la configuración TRAP/tbs eran capaces de reprimir el transgén en múltiples sitios en el mismo transcrito de ARNm.

Figura 20i. Esquema de los genomas de vector OXB-102 modificados para la utilización en el sistema TRIP. Se clonó la variante tbsx11M en los plásmidos de genoma de vector multicistrónico tal como se indica. Sólo se modificó el gen de fusión TH-CH1 cadena arriba para incluir la secuencia tbsx11M.

Figura 20ii. Represión de transgenes 'no problemáticos' durante la producción de vector en el sistema TRIP. Los vectores en la figura 20i se produjeron utilizando el sistema TRIP en células HEK293T: se cotransfectaron plásmidos de genoma del vector con pEF1a-coTRAP[H6] en una proporción 5:1, junto con componentes de empaquetamiento del vector VAIE. Se recolectó sobrenadante de vector y se tituló mediante ensayo de inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo anti-TH (A) y lisados celulares de final de producción sondeados con anticuerpos anti-TH y anti-CH1 en una membrana de inmunotransferencia (B). La represión de transgenes en las células de producción por el sistema TRAP/tbs era evidente, pero no presentó ningún impacto sobre la expresión del transgén en células diana, indicando que no se había transferido actividad asociada a TRAP detectable a las células diana y que tbs codificado en la 5'UTR del casete del transgén permitía una expresión robusta del transgén de fusión en células diferentes de las células de producción de TRIP.

Figura 21i. Una lista de homólogos de unión a ARN de triptófano procedentes de diferentes especies bacterianas sometidas a ensayo para la funcionalidad de represión de TRAP en células HEK293T. Nombre, linaje y número de referencia del NCBI de homólogos de TRAP sometidos a ensayo en el estudio. (Información adicional referente a la figura 11A)

Figura 21ii. Ensayo de diferentes homólogos de TRAP y variante S72N para la función de represión en casetes de tbs-GFP informador que contienen x11 repeticiones de RAGNN y x12 repeticiones de RAGNN. Se clonaron homólogos etiquetados con seis His en el plásmido de expresión pEF1a y se cotransfectaron en células HEK293T con plásmidos pCMV-tbsx11-GFP o pCMV-tbsx12-GFP en una proporción 1:5 (pTRAP:plInformador). Para los controles 'Sin TRAP', se utilizó pBluescript para generar niveles 'on' de expresión de GFP para comparar las variantes de TRAP. Se analizaron las células mediante citometría de flujo 2 días después de la transfección y se generaron puntuaciones de expresión de GFP en A] (IMF x %GFP). [B] muestra estos datos como factor de represión, respecto a los controles "Sin TRAP" para cada tbs-informador GFP. (Información adicional referente a la figura 11A)

Figura 21iii. Resumen de funcionalidades de diferentes homólogos de TRAP en el nuevo sistema de represión. Un resumen del factor de represión de los diferentes homólogos y variante S72N utilizando casetes de tbs-informador GFP con x11 o x12 repeticiones de RAGNN en células HEK293T. Los homólogos representan una diversa varianza de secuencia de aminoácidos (56-78%) en comparación con TRAP de *B. subtilis* (100%: las alineaciones incluyen la etiqueta de His). (Información adicional referente a la figura 11A)

Figura 22i. El casete de expresión de TRAP utilizado para aislar líneas celulares estables. Se modificó pEF1a-coTRAP[H6] de manera que se insertase IRES-Bsr entre TRAP[H6] y la señal de poliadenilación. Las secuencias bacterianas se extrajeron de la secuencia de ADN durante la linearización del plásmido, y este casete, codificando TRAP de *B. subtilis*, se transfectó establemente en células HEK293T de número bajo de pases. (Información adicional referente a la figura 11B)

Figura 22ii. Cribado de clones celulares de HEK293T.TRIP mediante transfección de plásmidos de informador GFP.

A. Se transfectaron por triplicado placas duplicadas de células subclonadas, con pCMV-GFP o pCMV-tbsx11GFP y se llevó a cabo FACS en las células 2 días después. Se calcularon puntuaciones de expresión para cada subclón (IMF x % de GFP) y se calculó el factor de represión dividiendo las Puntuaciones de expresión para pCMV-GFP (es decir, sin tbs) por las Puntuaciones de expresión para pCMV-tbsx11GFP para cada subclón (columnas etiquetadas "Factor de represión", eje derecho). (Información adicional referente a la figura 11B)

B. Inmunotransferencia de TRAP en lisados de clones celulares. Muestra los resultados para once subclones que expresaban TRAP[H6]; TRAP monomérico detectado con el anticuerpo anti-HIS₆. Se transfectaron transitoriamente células HEK293T con pEF1a-coTRAP[H6] y se utilizó el lisado como control positivo para la inmunotransferencia. (Información adicional referente a la figura 11B)

Figura 22iii. Título de vector VAIE mejorado utilizando células productoras que expresan establemente TARPÑ estudio de caso con una mezcla 50:50 de genomas de vector VAIE-[tbs]GFP y VAIE-[tbs]FVIII_h durante la producción.

A. Puntuaciones de expresión de GFP para células productoras de vector transfectadas con genomas de vector mixtos. Las células se transfectaron con VAIE-componentes de empaquetamiento de vector pGagPol, pVEVG, junto con los plásmidos de genoma de vector VAIE-[tbs]GFP y VAIE-[tbs]FVIII_h en una proporción 50:50. De esta manera, la expresión de FVIII_h en células de producción impactará negativamente sobre el título de las partículas de vector mixtas (VAIE-[tbs]FVIII_h es igual a ReQuinate-tbs; ver la figura 17i). Los genomas eran estándares o contenían tbs cadena arriba del transgén. También se añadieron EF1a-coTRAP[H6] (+TRAP TXN) o pBluescript (-) en donde se indica. Las células de producción eran células HEK293T o las líneas celulares TRAP estables 2F, 10H, 7E y 3D. Se calcularon puntuaciones de expresión de GFP (IMF x % de GFP) en células de final de producción.

B. Titulación de vector de recolección de vector en bruto EIAV-[tbs]GFP/FVIII_h en células HEK293T. Los sobrenadantes de vector en bruto procedentes de células de producción de vector en [A] se titularon en células HEK293T y el título se midió mediante FACS. Es conocido que la expresión de FactorVIII_h impacta sobre la actividad del virión del vector VAIE (ver la figura 17ii); de esta manera, sólo al reprimir la expresión del transgén en las células de producción (medida mediante GFP en [A]) pueden mejorarse los títulos de vector (medidos mediante GFP en [B]).

Figura 22iv. Incorporación mejorada de VEVG en partículas de vector EIAV-[tbs]GFP|EIAV-[tbs]FVIII_h mixtas producidas en el sistema TRIP estable o transitorio. Los sobrenadantes de vector procedentes de células de producción en el experimento de mezcla de genomas de vector VAIE-[tbs]GFP|EIAV-[tbs]FVIII_h se concentraron mediante centrifugación y se analizaron mediante inmunotransferencia utilizando un anticuerpo anti-VEVG. Se cargaron en todos los pocillos volúmenes iguales de preparaciones concentradas.

Figura 22v. Producción mejorada de un vector lentivírico codificante de transgén terapéutico utilizando una línea celular HEK293T.TRIP estable. Se utilizó la línea celular HEK293T.TRIP[3D] (*B. subtilis* TRAP[H6] de expresión estable) para producir VAIE-tbsCOX2 a escala de Cell Factory™, junto con células estándares (sin TRAP) y TRAP transfectado transitoriamente en células HEK293T. Los vectores se titularon mediante un ensayo de integración de ADN y UT/ml en comparación con los títulos de vector VAIE-GFP (fijados como 100%). Para los vectores VAIE-COX2, la utilización de células HEK293T.TRIP[3D] permiten la recuperación adicional de título de vector en comparación con TRAP transfectado transitoriamente en células HEK293T.

Figura 23i. Ensayo de la importancia de la elección de nucleótido en las posiciones "R" y "NN" de la repetición RAGNN en las secuencias tbs de longitud variable. El ensayo de 11x repeticiones RAGNN en el que la secuencia NN era GG, AA, TT[UU] o CC en el contexto de G en la posición R, reveló una preferencia para las pirimidinas en la posición NN. El orden general de funcionalidad era T[U]>C>G>A. Con el fin de someter a ensayo el nucleótido más funcional en la primera posición (R), se insertó cada nucleótido G, A, T[U] en repeticiones xAGAA dentro de tbs que comprendía x11, x8 o x6 repeticiones.

Figura 23ii. Ensayo de la preferencia G|T en la posición "R" de la repetición RAGTT y ensayo del apareamiento de nucleótidos con T dentro de los espaciadores NN. En el contexto de un tbs altamente represor (11xGAGTT), se intercambiaron progresivamente repeticiones de TAGTT en dicha secuencia de tbs x11. El incremento de las repeticiones de TAGTT (en sustitución de las repeticiones de GAGTT) redujo modestamente la función de represión de tbs. El ensayo de las repeticiones de GAGNN en donde por lo menos un N=T, reveló que se alcanza la represión máxima cuando la primera N (posición 4 de RAGNN) es preferentemente una T[U] o una pirimidina. Ello revela que las características importantes de RAGNN son una pirimidina en el primer espaciador N (posición 4) y G>T en la posición R. (no se sometió a ensayo GAGAT porque las repeticiones en tándem de esta secuencia RAGNN resultan en múltiples codones ATG cadena arriba de la ORF del transgén, lo que probablemente atenuaría la expresión del transgén).

Figura 24i. Variación de la posición y el número de copia de tbs dentro de la 5'UTR de un transgén con GFP para someter a ensayo la actividad de represión de TRAP. Se clonó la secuencia tbsx11M en pCMV-GFP en diferentes posiciones respecto al sitio CAP: 0nt [1], 34nt [2], 54nt [3] 74nt [4] o 114nt [5]; se derivaron secuencias adicionales añadidas al constructo que comprendía el líder de 34nt [2] (efectivamente el informador tbsx11M estándar) a partir de CMVp 5'UTR. La secuencia entre tbs y AUG también se incrementó a 43nt en el constructo [6]. Finalmente, se situaron dos copias de tbs en la 5'UTR con un espaciador de 34 nt entre ellas [7].

Figura 24ii. Ensayo del efecto de la variación de la posición de tbs dentro de la 5'UTR de un transgén con GFP sobre la actividad de represión de TRAP. Se sometieron a ensayo los siete constructos de informador GFP variantes en la figura 24i para su capacidad de resultar reprimidos por TRAP bajo tres condiciones: ausencia de TRAP (HEK293T), TRAP cotransfectado transitoriamente (HEK293T + TRAP) y condiciones de máxima represión de TRAP (HEK293T.TRIP[TRAP endógeno] + TRAP cotransfectado). Se analizaron los cultivos mediante citometría para medir la expresión de GFP 2 días después de la transfección y se generaron puntuaciones de expresión de GFP (IMF x % de GFP).

Figura 25i. Aplicación del sistema TRIP a la producción de vector con GFP basado en el VIH. [A] Se insertó tbs (la variante x11M) en un esqueleto de vector lentivírico basado en VIH codificante de GFP y se utilizó para producir preparaciones de vector en bruto en células HEK293T +/- pEF1a-coTRAP[H6]. [B] Se analizaron las células de final de producción mediante FACS para generar la puntuación de expresión de GFP (IMF x % de GFP; columnas etiquetadas con "Puntuaciones de expresión"). Los sobrenadantes de vector en bruto se titularon mediante ensayo de integración de ADN en células HEK293T (columnas etiquetadas "Título"). Se reprimió la expresión de GFP en un factor >100 en células de producción que expulsaban vector VIH-tbsGFP en presencia de TRAP, aunque los títulos de vector no resultaron afectados (ya que la proteína GFP no resulta perjudicial para la producción de vector). CMV - promotor del CMV, Ψ - señal de empaquetamiento, RRE - elemento respondedor de rev, wPRE - elemento post-transcripcional de marmota del VHB, ppu - tramo polipurina, SIN - U3/LTR autoinactivador.

Figura 25ii. Aplicación del sistema TRIP a la producción de vector terapéutico basado en el VIH. [A] Se insertó tbs (la variante x11M) en un esqueleto de vector lentivírico basado en VIH-1 codificante de 5T4-CAR y se utilizó para producir preparaciones de vector en bruto en células HEK293T +/- pEF1a-coTRAP[H6]. [B] Se titularon sobrenadantes de vector en bruto mediante FACS (VIH-GFP; 2 columnas a la izquierda) o ensayo de integración de ADN en células HEK293T (VIH-5T4.CAR; 2 columnas a la derecha). El sistema TRIP permitió una mejora de 10 veces de los títulos del vector VIH-5T4.CAR en comparación con la producción sin coexpresión de TRAP. CMV - promotor del CMV, Ψ - señal de empaquetamiento, RRE - elemento respondedor de rev, wPRE - elemento post-transcripcional Woodchuck del VHB, ppu - tramo polipurina, SIN - U3/LTR autoinactivador.

Figura 26. Análisis de los niveles de ARNm del transgén en células HEK293T transfectadas con componentes estándares o configuración TRAP-tbs. Se transfectaron células HEK293T con pCMV-GFP o pCMV-tbsGFP +/- pEF1a-coTRAP[H6] y las células se analizaron 48 horas después para la proteína GFP ([A]; FACS) y niveles de ARNm de GFP en el citoplasma ([B]; qRT-PCR de ARN citoplasmático tratado con ADNasa extraído, utilizando un juego de cebadores/sondas FAM específico de GFP). Estos datos demuestran que, aunque se produce una represión >100 veces de la proteína GFP en las células al utilizar la configuración TRAP-tbs, los niveles de ARNm de GFP no resultan apreciablemente afectados. [B] Ct refleja el ciclo de PCR al que se detecta en primer lugar una señal; a menor Ct, más abundante es la diana. Por lo tanto, la abundancia se incrementa en ~1,5 veces cada ciclo y 40 es señal indetectable. La condición -RT se refiere a una contaminación mínima con ADN plasmídico.

Figura 27i. Vectores basados en VIH codificantes de casete de transgén bicistrónico regulado por TRAP-tbs, controlado por promotores constitutivos o específicos de tejido. Se generaron cuatro constructos en los que el casete de transgén bicistrónico, codificante de la luciferasa de luciérnaga (1ª posición) y GFP (2ª posición), se transcribe a partir del promotor de CMV constitutivo y se regula diferencialmente al nivel de la traducción a través de TRAP-tbs. Se insertaron secuencias de tbs cadena arriba de ambos ORF del transgén, o el 1ª o el 2º transgén únicamente, o sin ninguna secuencia tbs. Además, se produjeron dos constructos en los que se utilizaron promotores específicos de tejido: el promotor VMD2 que está restringido a células fotorreceptoras, o el promotor mAlbAT, que es específico del hígado. Se generó un constructo de control en el que no se encontraba presente ningún promotor interno, de manera que pudiese medirse cualquier expresión de nivel bajo a partir del transcrito de ARN del vector de longitud completa.

Figura 27ii. Evaluación de la expresión del transgén a partir de vectores basados en VIH-1 codificantes de casete de transgén bicistrónico regulado por TRAP-tbs, controlado por promotores constitutivos o específicos de tejido en células de transfección HEK293T. Se cotransfectaron células HEK293T con genoma de vector bicistrónico de VIH-1 (figura 27i), pGagPol, pRev y pVEVG, y con pEF1a-coTRAP[H6] (+TRAP) o pBluescript (Control); la proporción de genoma a plásmido de TRAP era de 5 a 1. Se encontraba presente control de pGL3 (plásmido de expresión de luciferasa de *Renilla*) en todas las mezclas de transfección en una proporción 1:40 de la masa de ADN total. Se llevaron a cabo transfecciones por triplicado en placas de 96 pocillos por duplicado. Se utilizó una placa de 96 pocillos para el análisis de células de final de producción mediante citometría de flujo 2 días después de la transfección, generando Puntuaciones de expresión de GFP (IMF x % de GFP). Se utilizó la segunda placa para generar lisados celulares 2 días de la transfección para el ensayo dual de luciferasa (Promega).

Figura 27iii. Esquema que resume las capacidades de represión del sistema TRIP al aplicarlo a la producción de vectores retrovíricos (lentivíricos) codificantes de transgenes multicistrónicos. Un ejemplo de una célula de producción de vector lentivírico que utiliza el sistema TRIP para reprimir la expresión del transgén a partir de dos marcos de lectura abiertos (ORF) que utiliza un sistema interno de entrada ribosómica [IRES]. El casete de expresión de genoma del vector está regulado por un promotor fuerte [Pro Ext] que genera cantidades abundantes de ARN genómico del vector. El promotor interno [Pro Int.] puede ser un promotor fuerte/constitutivo, que conduce a niveles abundantes de transgén codificante/expresante de ARNm, o un promotor específico de tejido que puede ser o no ser débil, conduciendo a niveles mínimos/no codificantes/expresantes de ARNm de transgén. La secuencia de unión a TRAP [tbs] puede insertarse cadena arriba de una o ambas posiciones ORF; de esta manera, la expresión de TRAP dentro de la célula de producción reprimirá la producción de proteína desde niveles abundantes o bajos de ARNm del transgén. Además, el ARN genómico del vector puede expresar la proteína del transgén de una manera dependiente de Cap (típicamente niveles bajos) o de una manera independiente de Cap (desde un IRES; típicamente a niveles moderados a altos). De esta manera, esté activo o no el promotor interno, puede resultar posible la expresión del transgén durante la producción del vector y, por lo tanto, el sistema TRIP es más capaz de reprimir esta expresión en comparación con la utilización de promotores específicos de tejido. Pro Ext. - promotor externo; Ψ - señal de empaquetamiento; RRE - elemento respondedor a rev; cppt/CTS - tramo polipurina central/secuencia de terminador central; Pro Int. - promotor interno; tbs - secuencia de unión a TRAP; ORF - marco de lectura abierta; IRES - sitio interno de entrada ribosómica; WPRE - elemento regulador post-transcripcional de la hepatitis de marmota; ppu - tramo polipurina; Δ - U3 parcialmente deletado. (Observar que los casetes de empaquetamiento del vector y de expresión de TRAP no se muestran en el esquema aunque se asume que están presentes dentro de la célula de producción de vector de sistema TRIP en el presente ejemplo).

Figura 28i. Desarrollo del sistema TRIP-VAA Aplicación de la configuración TRAP-tbs a la producción de vectores basados en el VAA. Un sistema de vector VAA estándar utiliza tres componentes de ADN para la producción de vectores en células expresantes de adenovirus E1 (p.ej., células basadas en HEK293): genoma (opcionalmente con delección en un trs [Δtrs] para generar un genoma de vector VAA autocomplementario [ac]), RepCap y funciones de ayudante (en el presente ejemplo no limitativo, las funciones de ayudante son proporcionadas por el adenovirus E2A, E4orf6 y VA). El sistema TRIP-VAA utiliza la configuración TRAP-tbs: el genoma del vector VAA se modifica de manera que se inserta tbs en la 5'UTR del casete del transgén, y durante la producción del vector, se cointroduce un casete de expresión de TRAP, mediante cotransfección del plásmido expresante de TRAP y/o mediante la utilización de una línea celular que expresa establemente TRAP; TRAP opcionalmente puede estar etiquetado con His₆. ITR - repetición terminal invertida; Pro - elemento promotor eucariótico; tbs - secuencia de unión a TRAP; pA - señal de poliadenilación; [ITN] - intrón opcional. Esquema no a escala.

Figura 28ii. Represión de la expresión del transgén en el vector VAAsc en células HEK293T utilizando el sistema TRIP-VAA. Se cotransfectaron plásmidos codificantes de genomas de vector VAAsc-GFP de serotipo 2 (+/- tbs) en células HEK293T junto con diversos componentes a fin de medir su impacto sobre la represión del transgén mediada por TRAP-tbs. Las proporciones en masa de pscAAV-[tbs]GFP | pRepCap2 | pAyudante | pEF1a-coTRAP[H6] o pBlueScript (-) eran de 2 | 2 | 2 | 2 μg por placa de TC de 10 cm, excepto en donde variaban las

adiciones de pEF1a-coTRAP[H6], según se indica. El plásmido de control pCMV-tbsGFP (sin ITR de VAA2 flanqueantes) se sometió a las mismas condiciones para comparar los niveles de represión. La expresión de GFP a partir de los plásmidos pVAA2sc-[tbs]GFP era superior que a partir de pCMV-tbsGFP, posiblemente debido a que las secuencias de transcrito de ARNm eran más estables (las secuencias 3'UTR y la señal de poliA eran diferentes en diferentes constructos). TRAP era capaz de reprimir la expresión de GFP a partir de pVAA2sc-tbsGFP en más de 300 veces en presencia de pRepCap2 y pAyudante, es decir, durante la producción de vector VAAsc. La proporción de masas equivalentes de pEF1a-coTRAP[H6] a pVAA2sc-tbsGFP permitió una represión máxima bajo las condiciones de transfección utilizadas; la reducción de la adición de masa de pEF1a-coTRAP[H6] en 10 veces todavía permitió una represión medible de GFP del orden de 1-Log. No se observó represión para pVAAsc-GFP.

Figura 28iii. Comparación de la producción de vector VAAsc-[tbs]GFP utilizando los sistemas estándar y de TRIP-VAA. Se produjeron los vectores VAAsc-(CMV)-GFP o VAAscV-(CMV)-tbsGFP mediante cotransfección transitoria de masas iguales de genoma, pRepCap2, pAyudante y pEF1a-coTRAP[H6] o pBluescript en células HEK293T. Aproximadamente 53 horas después de la transfección, se recolectaron las células y se sometieron a ciclos de congelación-descongelación para liberar los viriones de VAA. Se purificaron los viriones de VAA utilizando un kit Virabind™, resultando en 100 µl de PBS que contiene vector de cada placa de 10 cm. Las preparaciones de vector se titularon en células HEK293T (columnas etiquetadas con "HEK293T") o células HEPG2 (columnas etiquetadas con "HEPG2") mediante citometría de flujo. Las puntuaciones de expresión de GFP para las células de producción de vector respectivas se representan gráficamente juntas (columnas etiquetas "GFP Expr scr"). Los datos muestran que, aunque la expresión de GFP en las células de producción de vector VAA está reprimida >300 veces y la configuración TRAP-tbs del sistema TRIP-VAA no presenta ningún impacto sobre la biología básica de la producción del vector VAA, los transgenes problemáticos/citotóxicos pueden bloquearse durante la producción del vector VAA.

Figura 28iv. Modelado de la producción de vectores VAA codificantes de transgenes problemáticos/citotóxicos utilizando Barnasa.

A. El genoma de vector VAA2sc-CMV-tbsBarnase codifica la ARNasa bacteriana Barnasa, cuyo ORF está optimizado para sus codones para la expresión en células humanas. Se insertó tbs en la 5'UTR del casete del transgén. Adicionalmente, se encuentra presente un casete de expresión bacteriana para Barstar (inhibidor natural de Barnasa) en el esqueleto del plásmido con el fin de ayudar a la propagación del plásmido en las bacterias, debido a la expresión con pérdidas ('leaky') del promotor del CMV en *E. coli*. El ORF de Barstar es codones optimizados para la expresión en *E. coli*.

B. Se utilizó el plásmido pVAAsc-CMV-GFP en transfecciones de mezcla de genomas para monitorizar el efecto de Barnasa sobre la expresión de GFP.

Figura 28v. Se llevó a cabo la mezcla de genomas mediante transfección de células HEK293T o HEK293T.TRIP[3D] con una mezcla 50:50 de plásmidos de genoma de vector pVAAsc-CMV-tbsBarnasa y pVAAsc-CMV-GFP, más pRepCap2 y pAyudante. Cada uno de los plásmidos de genoma se encontraba presente a razón de 1 µg/placa de 10 cm [i] o sólo se encontraba presente pVAAsc-CMV-GFP a razón de 2 µg/placa de 10 cm [ii], sin plásmido de expresión de TRAP adicional. Se obtuvieron fotografías de la expresión de GFP en estos cultivos 24 horas después de la transfección.

Figura 29i. Desarrollo del sistema TRIP-Adeno. Aplicación de la configuración TRAP-tbs a la producción de vectores basados en adenovirus. Los vectores adenovíricos estándares se clasifican en vectores de 1ª generación (delecionados en las regiones E1/E3), de 2ª generación (delecionados en E1/E2/E3/E4) y vectores dependientes de ayudante o "guttled". Además, los vectores oncolíticos activos en E1 pueden contener transgenes tóxicos codificados dentro de la región E1; por ejemplo, la expresión del gen tóxico puede estar controlada por el promotor tardío mayor de adenovirus o un promotor heterólogo y codificado por adenovirus o una señal de poliadenilación heteróloga. Las versiones del sistema TRIPAdeno de estos tipos de genomas de vector alojan tbs dentro de la 5'UTR del transcrito codificante del transgén. Durante la producción de vector, se cointroduce un casete de expresión de TRAP, mediante cotransfección del plásmido expresante de TRAP y/o mediante la utilización de una línea celular expresante de TRAP; TRAP puede estar opcionalmente etiquetado con His6. ITR - repetición terminal invertida; Pro - elemento promotor eucariótico; tbs - secuencia de unión a TRAP; pA - señal de poliadenilación; [ITN] - intrón opcional. Esquema no a escala.

Figura 29ii. Represión del transgén de GFP de componentes de genoma de vector adenovírico de primera generación en célula HEK293T utilizando la configuración TRAP-tbs. Se transfectaron células HEK293T con plásmido lanzadera pAd-CMV-GFP o pAd-CMV-tbsGFP (que contenía el lado izquierdo del genoma del vector adenovírico) junto con pEF1a-coTRAP[H6] (+TRAP) o pBluescript (-) [A], y se llevó a cabo citometría de flujo 48 horas después [B]. Además, transfecciones paralelas incluían el esqueleto RAPAd® (pacAd5 9.2-100: contiene el lado derecho del genoma del vector adenovírico), que simula la producción de vector adenovírico de primera generación utilizando el kit RAPAd® (en el que la recombinación del genoma del vector se produce en las células HEK293T). Se generaron puntuaciones de expresión de GFP (IMF x % de GFP) bajo cada condición. Se observó una represión de más de 100 veces de GFP únicamente en presencia de tbs dentro del plásmido lanzadera y al expresarse TRAP. ITR - repetición terminal invertida; CMV - promotor del CMV; Ψ - señal de empaquetamiento; tbs - secuencia de unión a TRAP; pA - señal de poliadenilación. Esquema no a escala.

Figura 29iii. Represión del transgén de GFP durante la amplificación del vector Adeno-tbsGFP (con delección de E1/E3) en células HEK293T.TRIP. Se utilizaron reservas de vector Adeno-CMV-GFP y Adeno-CMV-tbsGFP generadas mediante cotransfección de lanzaderas pAd-CMV-GFP o pAd-CMV-tbsGFP con el esqueleto pRAPAd® y pEF1a-coTRAP[H6] (ver la figura 29ii) para transducir células HEK293T o células HEK293T.TRIP[3D] (de

expresión estable de TRAP[H6]) a una MDI de 0,01. [A] Se analizaron réplicas de cultivo mediante citometría de flujo en diferentes puntos temporales posteriores a la transducción con el fin de evaluar la expresión de GFP durante la amplificación del vector. Se generaron puntuaciones de expresión de GFP (IMF x % de GFP) bajo cada condición. [B] Se sometieron a congelación-descongelación réplicas de cultivo de final de curso temporal para liberar las partículas de vector; se eliminaron los residuos celulares mediante centrifugación y los sobrenadantes en bruto se titularon en células HeLa.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

A continuación, se describen diversas características y realizaciones preferentes de la presente invención mediante ejemplos no limitativos.

La práctica de la presente invención utiliza, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de química, biología molecular, microbiología e inmunología, que se encuentran comprendidas dentro de las capacidades del experto ordinario en la materia. Tales técnicas se explican en la literatura. Ver, por ejemplo, J. Sambrook, E. F. Fritsch y T. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición, volúmenes 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; Ausubel, F. M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, cap. 9, 13 y 16, John Wiley & Sons, New York, NY, 1995 y suplementos periódicos; B. Roe, J. Crabtree y A. Kahn, *DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques*, John Wiley & Sons, 1996; J. M. Polak y James O'D. McGee, *In Situ Hybridization: Principles and Practice*; Oxford University Press, 1990; M. J. Gait (ed.), *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press, 1984; y D. M. J. Lilley y J. E. Dahlberg, *Methods of Enzymology: DNA Structure Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology*, Academic Press, 1992.

En un aspecto, la exposición proporciona una secuencia de ácidos nucleicos que comprende un sitio de unión operablemente ligado a un nucleótido de interés, en el que el sitio de unión es capaz de interactuar con una proteína de unión a ARN, de manera que la traducción del nucleótido de interés resulta reprimida o bloqueada en una célula de producción del vector vírico.

La expresión "proteína de unión a ARN" debe entenderse como una proteína que es capaz de unirse a una secuencia de ácidos nucleicos. En el contexto de la presente invención, la unión de la proteína de unión a ARN a su secuencia de sitio de unión presenta el efecto de reprimir o bloquear la traducción de un nucleótido de interés al que se encuentra operablemente ligado el sitio de unión en una célula de producción de vector vírico.

En una realización preferente, la proteína de unión a ARN es la proteína de atenuación de la unión a ARN del triptófano (TRAP), por ejemplo la proteína de atenuación de la unión a ARN del triptófano bacteriana.

En otra realización, la proteína de unión a ARN es la proteína A del sistema de regulación del almacenamiento de carbono conservado en bacterias (CsrA).

En otra realización, la proteína de unión a ARN es la proteína US11 de unión a ARN del virus 1 del herpes simplex.

Proteína de atenuación de la unión a ARN del triptófano (TRAP)

La proteína de atenuación de la unión a ARN del triptófano (TRAP) es una proteína bacteriana que ha sido ampliamente caracterizada en *Bacillus subtilis*. Regula la biosíntesis del triptófano dirigida a partir del operón *trpEDCFBA* mediante la participación en la atenuación de la transcripción o en mecanismos de control traduccional (revisión en Gollnick, B., Antson y Yanofsky, *Annual Review of Genetics* 39: 47-68, 2005).

En su contexto natural, TRAP regula la biosíntesis y transporte del triptófano mediante tres mecanismos diferentes:

1. Atenuación de la transcripción del operón *trpEDCFBA* (Shimotsu H, K. M., Yanofsky C, Henner DJ. *Journal of Bacteriology* 166: 461-471, 1986).
2. Estimulación de la formación de la horquilla de bloqueo de Shine-Dalgarno de *trpE* y *trpD* (Yakhnin H, B. J., Yakhnin AV, Babitzke P, *Journal of Bacteriology* 183(20): 5918-5926, 2001).
3. Bloqueo del acceso ribosómico a los sitios de unión ribosómica *trpG* y *yhaG* (Yang M, d. S. A., van Loon APGM, Gollnick P., *Journal of Bacteriology* 177: 4272-4278, 1995).

En *Bacillus subtilis* TRAP está codificado por un único gen (*mtrB*) y la proteína funcional está compuesta de 11 subunidades idénticas dispuesta en forma de un anillo toroide (Antson AA, D. E., Dodson G, Greaves RB, Chen X, Gollnick P., *Nature* 401(6750): 235-242, 1999). Resulta activado para interactuar con el ARN mediante la unión a hasta 11 moléculas de triptófano en bolsillos entre subunidades vecinas. El ARN diana se enrolla en torno al exterior de esta estructura de anillo cuaternaria (Babitzke P, S. J., Shire SJ, Yanofsky C., *Journal of Biological Chemistry* 269: 16597-16604, 1994).

Sin respaldo teórico, en el mecanismo natural de detección y control de la síntesis del triptófano, se considera que TRAP actúa al nivel de la terminación de la transcripción mediante la unión a un sitio de unión en el ARN líder de nueva síntesis. Ello desestabiliza una secuencia antiterminador solapante, de manera que un terminador

independiente de rho situado cadena abajo se encuentra activo, conduciendo a la producción de sólo ARNs cortos. En el caso de que el triptófano sea limitante dentro de la bacteria, el anillo TRAP ya no puede unirse a su sitio de unión de ARN. Por consiguiente, se activa el antiterminador y continúa la transcripción entrando en el operón génico de síntesis de triptófano. TRAP también puede actuar al nivel de la traducción: la unión dependiente del triptófano de TRAP a su sitio de unión en la 5'UTR del transcrito de ARN libera una secuencia anti-Shine-Dalgarno; esto forma un tallo estable con la secuencia de Shine-Dalgarno de manera que se reprime el inicio de la traducción en el ribosoma. Finalmente, en otros contextos, cuando TRAP está unido a su sitio de unión de ácidos nucleicos, es capaz de reprimir el inicio de traducción mediante el bloqueo físico del complejo ribosómico 40S en escaneo antes de que alcance el codón de inicio, a raíz de lo cual se habría formado una maquinaria de traducción más estable y de afinidad más elevada.

En una realización de la presente invención, TRAP se deriva de *Bacillus subtilis*. Por ejemplo, TRAP puede comprender la secuencia:

MNQKHSSDFVVIKAVEDGVNVI GLTRGDTK FHHSEKLDKGEVIAAQFTEHTSAIKVR
 GEALIQ TAYGEMKSEKK (SEQ ID NO: 1)

En una realización preferente de la presente invención, SEC ID nº 1 está etiquetada C-terminalmente con seis aminoácidos histidina (etiqueta HISx6).

En una realización alternativa, TRAP se deriva de *Aminomonas paucivorans*. Por ejemplo, TRAP puede comprender la secuencia:

MKEGEEAKTSVLS DYVVVKALENGVTVI GLTRGQETKFAHTEKLD DGEVWIAQFTE
 HTSAIKVRGASEIHTKHGMLFSGRGRNEKG (SEQ ID NO: 2)

En una realización alternativa, TRAP se deriva de *Desulfotomaculum hydrothermale*. Por ejemplo, TRAP puede comprender la secuencia:

MNPM TDRSDITGDYVVVKALENGVTIIGL TRGGVTKFHHTEKLDKGEIMIAQFTEHTS
 AIKIRGRAELLTKHGKIRTEVDS (SEQ ID NO: 3)

En una realización alternativa, TRAP se deriva de *B. stearothermophilus*. Por ejemplo, TRAP puede comprender la secuencia:

MYTNSDFVVIKALE DGVNVI GLTRGADTRFHHSEKLDKGEVLIAQFTEHTSAIKVRGK
 AYIQTRHGVIESEGKK (SEQ ID NO: 4)

En una realización alternativa, TRAP se deriva de *B. stearothermophilus* S72N. Por ejemplo, TRAP puede comprender la secuencia:

MYTNSDFVVIKALE DGVNVI GLTRGADTRFHHSEKLDKGEVLIAQFTEHTSAIKVRGK
 AYIQTRHGV IENEGKK (SEQ ID NO: 5)

En una realización alternativa, TRAP se deriva de *B. halodurans*. Por ejemplo, TRAP puede comprender la secuencia:

MNVGDNSNFFVIKAKENGVN VFGMTRGDTRFHHSEKLDKGEVMIAQFTEHTSAV
 KIRGKAIQTSYGTLDTEKDE (SEQ ID NO: 6)

En una realización alternativa, TRAP se deriva de *Carboxydothemus hydrogenoformans*. Por ejemplo, TRAP puede comprender la secuencia:

MVCDNF AFSSAINAEYIVVKALENGVTIMGL TRGKDTK FHHTEKLDKGEVMVAQFTE
 HTSAIKIRGKAEIYTKHGVKNE (SEQ ID NO: 7)

En una realización, TRAP está codificada por *mtrb* de la familia génica de proteínas de atenuación de la unión del ARN del triptófano (superfamilia TrpBP, p.ej., con nº cl03437 de la base de datos de dominios conservados del NCBI).

En realizaciones preferentes, TRAP está etiquetada C-terminalmente con seis aminoácidos histidina (etiqueta HISx6).

5 En una realización preferente, TRAP comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% ó 100% respecto a cualquiera de SEC ID nº 1 a 7 y es capaz de interactuar con un sitio de unión a ARN de manera que la expresión de un NDI operablemente modificado no resulta modificado, por ejemplo reprimido o bloqueado, en una célula de producción de vector vírico.

10 En una realización preferente, TRAP comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99% ó 100% respecto a cualquiera de SEC ID nº 1 a 7 y es capaz de interactuar con un sitio de unión a ARN de manera que la expresión de un NDI operablemente modificado no resulta modificado, por ejemplo reprimido o bloqueado, en una célula de producción de vector vírico.

15 En otra realización, la proteína de unión a ARN (p.ej., TRAP) puede estar codificada por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que es capaz de interactuar con un sitio de unión a ARN de manera que la expresión de un NDI operablemente ligado resulta modificada, por ejemplo reprimida o bloqueada, en una célula de producción de vector vírico. Por ejemplo, TRAP puede estar codificada por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de SEC ID nº 1 a 7.

20 Todas las variantes, fragmentos u homólogos de proteínas de unión a ARN, tales como TRAP, para la utilización en la invención conservarán la capacidad de unirse al sitio de unión de la invención, de manera que la traducción del NDI (que puede ser un gen marcador) resulte reprimida o bloqueada en una célula de producción de vector vírico.

Proteína de unión a ácido nucleico

25 La expresión "sitio de unión" debe entenderse como una secuencia de ácidos nucleicos que es capaz de interactuar con una determinada proteína. El sitio de unión de ácidos nucleicos de la presente invención puede ser uno que sea capaz de interactuar con la proteína de unión a ARN de la invención, por ejemplo la proteína de atenuación de la unión a ARN del triptófano (TRAP).

30 En el caso de TRAP, un sitio de unión a ácidos nucleicos de consenso que es capaz de unión a TRAP es [RAGNN] múltiples veces repetidas (p.ej., 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más veces); dicha secuencia se encuentra en el operón *trp* nativo. En el contexto nativo, ocasionalmente AAGNN resulta tolerado y ocasionalmente N nucleótidos "espaciadores" adicionales resultan en una secuencia funcional. Experimentos *In vitro* han demostrado que por lo menos 6, o más, repeticiones de consenso resultan necesarias para la unión TRAP-ARN (Babitzke P, Y. J., Campanelli D., Journal of Bacteriology 178(17): 5159-5163, 1996). Por lo tanto, preferentemente en una realización hay 6 o más secuencias contiguas [RAGN₂] presentes en tbs, en el que R puede ser T o G en ADN y U o G en ARN.

40 En una realización de la presente invención, el sitio de unión a TRAP comprende la secuencia RAGN₂₋₃ (p.ej., RAGN₂₋₃). Por lo tanto, a fin de evitar dudas, dicho sitio de unión a ácidos nucleicos comprende, por ejemplo, cualquiera de las secuencias UAGNN, GAGNN, TAGNN, UAGNNN, GAGNNN o TAGNNN.

45 Debe entenderse que "N" especifica cualquier nucleótido en esa posición en la secuencia. Por ejemplo, podría ser G, A, T, C o U. El número de dichos nucleótidos es preferentemente 2, aunque hasta tres, por ejemplo 1, 2 o 3 repeticiones RAG de un tbs de repetición 11x pueden estar separadas por 3 nucleótidos espaciadores y todavía conservar cierta actividad de unión a TRAP que conduce a la represión de la traducción. Preferentemente se utiliza no más de un espaciador N₃ en un tbs de repetición 11x con el fin de conservar la actividad máxima de unión a TRAP que conduce a la represión de la traducción.

50 En otra realización, el sitio de unión a ácidos nucleicos comprende múltiples repeticiones de RAGN₂₋₃ (p.ej., múltiples repeticiones de RAGN₂₋₃).

En otra realización, el sitio de unión a ácidos nucleicos comprende múltiples repeticiones de RAGN₂₋₂.

55 En otra realización, el sitio de unión a ácidos nucleicos comprende por lo menos 6 repeticiones de RAGN₂₋₂ (p.ej., por lo menos 6 repeticiones de RAGN₂₋₃).

En otra realización, el sitio de unión a ácidos nucleicos comprende por lo menos 6 repeticiones de RAGN₂. Por ejemplo, el sitio de unión a ácidos nucleicos puede comprender 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más repeticiones de RAGN₂.

60 En otra realización, el sitio de unión a ácidos nucleicos comprende por lo menos 8 repeticiones de RAGN₂₋₂ (p.ej., por lo menos 8 repeticiones de RAGN₂₋₃).

Preferentemente, el número de repeticiones de RAGNNN presente en el sitio de unión a ácidos nucleicos es de 1 o menos.

65 En otra realización, el sitio de unión a ácidos nucleicos comprende 11 repeticiones de RAGN₂₋₂ (p.ej., 11 repeticiones

de RAGN₂₋₃). Preferentemente, el número de repeticiones de RAGNNN presente en este sitio de unión a ácidos nucleicos es de 3 o menos.

5 En otra realización, el sitio de unión a ácidos nucleicos comprende 12 repeticiones de RAGN_{≥2} (p.ej., 12 repeticiones de RAGN₂₋₃).

En una realización preferente, el sitio de unión a ácidos nucleicos comprende 8 a 11 repeticiones de RAGN₂ (p.ej., 8, 9, 10 o 11 repeticiones de RAGN₂).

10 Por ejemplo, el sitio de unión a TRAP puede comprender cualquiera de las secuencias siguientes:

GAGUUUAGCGGAGUGGAGAAGAGCGGAGCCGAGCCUAGCAGAGACGAGUGG

AGCU (SEQ ID NO: 8); or

GAGUUUAGCGGAGUGGAGAAGAGCGGAGCCGAGCCUAGCAGAGACGAGAAG

AGCU (SEQ ID NO: 9)

15 La expresión "repeticiones de RAGN_{≥2}" debe entenderse que se refiere a que el motivo general RAGN_{≥2} (p.ej., RAGN₂₋₃) se encuentra repetido. Pueden unirse diferentes secuencias RAGN_{≥2} que satisfacen los criterios de dicho motivo para generar el sitio de unión a ácidos nucleicos. No se pretende que el sitio de unión a ácidos nucleicos resultante se encuentre limitado a repeticiones de únicamente una secuencia que satisfaga los requisitos de este motivo, aunque esta posibilidad se encuentra incluida en la definición. Por ejemplo, "6 repeticiones de RAGN_{≥2}" incluye, aunque sin limitación, las secuencias:

UAGUU-UAGUU-UAGUU-UAGUU-UAGUU-UAGUU (SEC ID n° 10);

UAGUU-UAGUU-GAGUU-UAGUU-GAGUU-UAGUU (SEC ID n° 11);

25 GAGUUU-GAGUU-GAGUU-GAGUUU-GAGUU-GAGUU (SEC ID n° 12)

y

UAGUUU-GAGUU-UAGUU-GAGUUU-UAGUU-GAGUU (SEC ID n° 13)

(los guiones se incluyen entre las repeticiones únicamente en aras de la claridad).

30 Un tbs de 8 repeticiones que contiene una repetición RAGNNN y siete repeticiones RAGNN conserva actividad de represión mediada por TRAP. Las secuencias tbs de menos de 8 repeticiones (p.ej., secuencias tbs de 7 o 6 repeticiones) que contienen una o más repeticiones de RAGNNN pueden presentar una actividad de represión mediada por TRAP más baja. De acuerdo con lo anterior, en presencia de menos de 8 repeticiones, resulta preferente que tbs comprenda únicamente repeticiones de RAGNN.

35

Los nucleótidos preferentes para la utilización en el consenso de repetición de RAGNN son:

- una pirimidina en por lo menos una de las posiciones espaciadoras NN,
- una pirimidina en por lo menos la primera de las posiciones espaciadoras NN,
- pirimidinas en ambas posiciones espaciadoras NN,
- G en la posición R.

40 También resulta preferente utilizar G en la posición R en el caso de que las posiciones espaciadoras NN sean AA (es decir, resulta preferente que no se utilice TAGAA como una repetición en la secuencia de consenso).

45

La expresión "capaz de interactuar" debe entenderse que se refiere a que el sitio de unión a ácidos nucleicos es capaz de unión a una proteína, por ejemplo TRAP, bajo las condiciones presentes en una célula, por ejemplo en una célula de producción de vector vírico eucariótica. Dicha interacción con una proteína de unión a ARN, tal como TRAP, resulta en la represión o bloqueo de la traducción de un NDI al que se encuentra operablemente ligado el sitio de unión a ácidos nucleicos.

50

La expresión "operablemente ligado" se refiere a que los componentes indicados se encuentran en una relación que les permite funcionar de la manera que se pretende. Por lo tanto, un sitio de unión a ARN de la invención operablemente ligado a un NDI está situado de manera que la traducción del NDI resulta modificada al unirse una proteína de unión a ARN, tal como TRAP, al sitio de unión a ARN.

55

La situación de un sitio de unión a ácidos nucleicos capaz de interactuar con una proteína de unión a ARN (p.ej., una secuencia de unión a TRAP, tbs) cadena arriba de un codón de inicio de traducción de NDI de un marco de lectura abierta (ORF) dado permite la represión de la traducción específica del ARNm derivado de dicho ORF. El número de nucleótidos que separan el sitio de unión a TRAP y el codón de inicio de la traducción puede variar, por ejemplo de 0

60

a 12 nucleótidos, sin afectar al grado de represión. A título de ejemplo adicional, pueden utilizarse 0 a 43 nucleótidos para separar el sitio de unión a TRAP y el codón de inicio de la traducción.

5 La represión o bloqueo de la traducción del NDI debe entenderse como la alteración de la cantidad de producto (p.ej., proteína) del NDI que se traduce durante la producción del vector vírico en comparación con la cantidad expresada en ausencia del sitio de unión a ácidos nucleicos de la invención en el punto temporal equivalente. Dicha alteración de la traducción resulta en la represión o bloqueo de la expresión consecuente de la proteína codificada por el NDI.

10 En una realización de la presente invención, el sitio de unión a ácidos nucleicos es capaz de interactuar con una proteína de unión a ARN, tal como la proteína de atenuación de la unión a ARN del triptófano (TRAP), de manera que la traducción del nucleótido de interés resulta reprimida o bloqueada en una célula de producción de vector vírico.

15 La traducción del NDI en cualquier tiempo dado durante la producción del vector puede reducirse en 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% o 0,1% de la cantidad traducida en ausencia de la secuencia de ácidos nucleicos de la invención en el mismo punto temporal durante la producción del vector.

20 La traducción del NDI en cualquier tiempo dado durante la producción del vector puede reducirse a menos de 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% o 0,1% de la cantidad traducida en ausencia de la secuencia de ácidos nucleicos de la invención en el mismo punto temporal durante la producción del vector.

El bloqueo de la traducción del NDI debe entenderse como reducir la cantidad de traducción a sustancialmente cero.

25 La expresión de la proteína a partir del NDI en cualquier tiempo dado durante la producción del vector puede reducirse en 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% o 0,1% de la cantidad expresada en ausencia de la secuencia de ácidos nucleicos de la invención en el mismo punto temporal durante la producción del vector.

30 La expresión de la proteína a partir del NDI en cualquier tiempo dado durante la producción del vector puede reducirse a menos de 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% o 0,1% de la cantidad expresada en ausencia de la secuencia de ácidos nucleicos de la invención en el mismo punto temporal durante la producción del vector.

35 El bloqueo de la expresión de la proteína a partir del NDI debe entenderse como reducir la cantidad de proteína que se expresa a sustancialmente cero.

Los métodos para el análisis y/o cuantificación de la traducción de un NDI son bien conocidos de la técnica.

40 Puede analizarse un producto proteína de células lisadas utilizando métodos tales como el análisis de SDS-PAGE con visualización con tinción de Coomassie o de plata. Alternativamente, puede analizarse un producto proteína utilizando transferencia Western o ensayos de inmunosorción ligada a enzima (ELISA) con sondas de anticuerpos que se unen al producto proteína. Puede analizarse el producto proteína en las células intactas mediante inmunofluorescencia.

Nucleótido de interés

45 En una realización de la invención, el nucleótido de interés se traduce en una célula diana que no presenta la proteína de unión a ARN, por ejemplo la proteína de atenuación de la unión a ARN del triptófano (TRAP).

50 La "célula diana" debe entenderse como una célula en la que se desea expresar el NDI. El NDI puede introducirse en la célula diana utilizando un vector vírico de la presente invención. La administración en la célula diana puede llevarse a cabo *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*.

En una realización preferente, el nucleótido de interés da lugar a un efecto terapéutico.

55 El NDI puede presentar una aplicación terapéutica o diagnóstica. Entre los nDI adecuados se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, secuencias codificantes de enzimas, cofactores, citoquinas, quimioquinas, hormonas, anticuerpos, moléculas antioxidantes, moléculas de tipo inmunoglobulina manipuladas, anticuerpos de cadena sencilla, proteínas de fusión, moléculas coestimuladoras inmunológicas, moléculas inmunomoduladoras, receptores de antígeno quiméricos, mutante negativo para el dominio trans de una proteína diana, toxinas, toxinas condicionales, antígenos, proteínas supresoras tumorales, factores de crecimiento, proteínas membranales, receptores, proteínas y péptidos vasoactivos, proteínas y ribozimas antivíricos, y derivados de los mismos (tales como derivados con un grupo informador asociado). Los NDI pueden codificarse además micro-ARN. Sin deseo de restringirse a ninguna teoría, se cree que el procesamiento del micro-ARN puede resultar inhibido por TRAP.

65 En una realización, el NDI puede resultar útil en el tratamiento de trastornos neurodegenerativos.

En una realización, el NDI puede resultar útil en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

5 En otra realización, el NDI puede codificar un enzima o enzimas que participan en la síntesis de la dopamina. Por ejemplo, el enzima puede ser uno de los siguientes: tirosina hidroxilasa, GTP-ciclohidrolasa 1 y/o aminoácido aromático dopa descarboxilasa. Las secuencias de los tres genes se encuentran disponibles (GenBank® acceso nº X05290, U19523 y M76180, respectivamente).

10 En otra realización, el NDI puede codificar el transportador 2 de monoamina vesicular (VMAT2). En una realización alternativa, el genoma vírico puede comprender un NDI codificante del aminoácido aromático dopa descarboxilasa y un NDI codificante de VMAT2. Dicho genoma puede utilizarse en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, en particular junto con la administración periférica de L-DOPA.

En otra realización, el NDI puede codificar una proteína terapéutica o combinación de proteínas terapéuticas.

15 En otra realización, el NDI puede codificar una proteína o proteínas seleccionadas del grupo que consiste en factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factor neurotrófico ciliar (CNTF), neurotrofina-3 (NT-3), factor de crecimiento fibroblástico ácido (aFGF), factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), interleuquina-1 beta (IL-1 β), factor alfa de necrosis tumoral (TNF- α), factor de crecimiento insulínico tipo 2, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C/VEGF-2, VEGF-D, VEGF-E, PDGF-A, PDGF-B, heterodímeros y homodímeros de PDFG-A y PDFG-B.

20 En otra realización, el NDI puede codificar una proteína antiangiogénica o proteínas antiangiogénicas seleccionadas del grupo que consiste en angiostatina, endostatina, factor plaquetario 4, factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF), restina, interferón- α , proteína inducible por interferón, gro-beta y tubedown-1, interleuquina (IL)-1, IL-12, ácido retinoico, anticuerpos anti-VEGF o fragmentos/variante de los mismos, trombospondina, proteínas receptoras del VEGF, tales como las indicadas en las patentes US nº 5.952.199 y 6.100.071, y anticuerpos anti-receptor de VEGF.

25 En otra realización, el NDI puede codificar el regulador de la conductancia transmembranal de la fibrosis quística (CFTR).

30 En otra realización, el NDI puede codificar una proteína que se expresa normalmente en una célula ocular.

En otra realización, el NDI puede codificar una proteína que se expresa normalmente en una célula fotorreceptor y/o célula del epitelio pigmentario retiniano.

35 En otra realización, el NDI puede codificar una proteína seleccionada del grupo que comprende RPE65, proteína receptora tipo 1 de interacción con arilhidrocarburo (AIPL1), CRB1, lecitina aciltransferasa retiniana (LRAT), caja homeo específica de fotorreceptor (CRX), guanilato ciclasa retiniana (GUCY2D), proteína 1 de interacción con RPGR (RPGRIP1), LCA2, LCA3, LCA5, distrofina, PRPH2, CNTF, ABCR/ABCA4, EMP1, TIMP3, MERTK, ELOVL4, MYO7A, USH2A, VMD2, RLBP1, COX-2, FPR, harmonina, proteína Rab escolta 1, CNGB2, CNGA3, CEP 290, RPGR, RS1, RP1,PRELP, enzimas de la ruta del glutatión y opticina.

40 En otras realizaciones, el NDI puede codificar Factor VIII o Factor IX humano.

45 En otras realizaciones, el NDI puede codificar un receptor de antígeno quimérico (CAR) o un receptor de células T (TCR).

50 En realizaciones adicionales, el NDI puede codificar SGSH, SUMF1, GAA, la cadena gamma común (CD132), adenosina desaminasa, proteína WAS, globinas, alfa galactosidasa A, δ -aminolevulinato (ALA) sintasa, δ -aminolevulinato deshidratasa (ALAD), hidroximetilbilano (HMB) sintasa, Uroporfirinógeno (URO) sintasa, Uroporfirinógeno (URO) descarboxilasa, Coproporfirinógeno (COPRO) oxidasa, Protoporfirinógeno (PROTO) oxidasa, Ferroquelatasa, α -L-iduronidasa, Iduronato sulfatasa, Heparán sulfamidasa, N-acetilglucosaminidasa, Heparán- α -glucosaminida N-acetiltransferasa, 3 N-acetilglucosamina 6-sulfatasa, Galactosa-6-sulfato sulfatasa, β -galactosidasa, N-acetilgalactosamina-4-sulfatasa, β -glucuronidasa y Hialuronidasa.

55 Además, del NDI, el vector puede comprender o codificar además un ARNip, ARNhc o ARNhc regulado. (Dickins et al. Nature Genetics 37: 1289-1295, 2005, Silva et al. Nature Genetics 37:1281-1288, 2005).

Indicaciones

60 Los vectores, incluyendo vectores retrovíricos y VAA, según la presente invención pueden utilizarse para administrar uno o más NDI útiles en el tratamiento de los trastornos listados en los documentos nº WO 1998/05635, WO 1998/07859 y WO 1998/09985 El nucleótido de interés puede ser de ADN o ARN. Se proporcionan ejemplos de dichas enfermedades a continuación:

65 un trastorno que responde a citoquinas y actividad de proliferación/diferenciación celular, actividad inmunosupresora o inmunoestimuladora (p.ej., para tratar deficiencias inmunológicas, incluyendo la infección

con virus de la inmunodeficiencia humana, regulación del crecimiento de linfocitos, el tratamiento del cáncer y muchas enfermedades autoinmunitarias, y para prevenir el rechazo del trasplante o inducir inmunidad tumoral), regulación de la hematopoyesis (p.ej., el tratamiento de enfermedades mieloides o linfoides), estimulación del crecimiento de hueso, cartílago, tendones, ligamentos y tejidos nerviosos (p.ej., para cicatrizar heridas, el tratamiento de quemaduras, úlceras y enfermedad periodontal y neurodegeneración), la inhibición o activación de la hormona folículo-estimulante (modulación de la fertilidad), actividad quimiotáctica/quimiocinética (p.ej., para movilizar tipos celulares específicos a sitios de lesión o infección), actividad hemostática y trombolítica (p.ej., para tratar hemofilia e ictus), actividad antiinflamatoria (para tratar, por ejemplo, choque séptico o enfermedad de Crohn), actividad inhibidora de los macrófagos e inhibidora de las células T y, de esta manera, actividad antiinflamatoria; actividad antiinmunitaria (es decir, efectos inhibidores de la respuesta inmunitaria celular y/o humoral, incluyendo una respuesta no asociada a inflamación), inhibición de la capacidad de los macrófagos y células T de adherirse a componentes de la matriz extracelular y la fibronectina, así como la expresión regulada positivamente de receptor fas en células T.

Trastornos de malignidad, incluyendo cáncer, leucemia, crecimiento tumoral benigno y maligno, invasión y extensión, angiogénesis, metástasis, ascites y efusión pleural maligna.

Enfermedades autoinmunitarias, incluyendo artritis, incluyendo artritis reumatoide, hipersensibilidad, reacciones alérgicas, asma, lupus eritematoso sistémico, enfermedades del colágeno y otras enfermedades.

Enfermedades vasculares, incluyendo arterioesclerosis, enfermedad cardíaca aterosclerótica, lesión por reperfusión, paro cardíaco, infarto de miocardio, trastornos inflamatorios vasculares, síndrome del estrés respiratorio, efectos cardiovasculares, enfermedad vascular periférica, migraña y antitrombosis dependiente de aspirina, ictus, isquemia cerebral, enfermedad cardíaca isquémica y otras enfermedades.

Enfermedades del tracto gastrointestinal, incluyendo úlcera péptica, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn y otras enfermedades.

Enfermedades hepáticas, incluyendo fibrosis hepática, cirrosis hepática u otras enfermedades.

Enfermedades renales y urológicas, incluyendo tiroiditis u otras enfermedades glandulares, glomerulonefritis u otras enfermedades.

Trastornos del oído, nariz y garganta, incluyendo otitis u otras enfermedades otorrinolaringológicas, dermatitis u otras enfermedades dérmicas.

Trastornos dentales y orales, incluyendo enfermedades periodontales, periodontitis, gingivitis u otras enfermedades dentales/orales.

Enfermedades testiculares, incluyendo orquitis o epididimo-orquitis, infertilidad, traumatismo orquidal u otras enfermedades testiculares.

Enfermedades ginecológicas, incluyendo disfunción placentaria, aborto habitual, eclampsia, pre-eclampsia, endometriosis y otras enfermedades ginecológicas.

Trastornos oftalmológicos, tales como la uveítis posterior, uveítis intermedia, uveítis anterior, conjuntivitis, coriorretinitis, uveorretinitis, neuritis óptica, glaucoma, incluyendo el glaucoma de ángulo abierto y el glaucoma congénito juvenil, inflamación intraocular, p.ej., retinitis o edema macular cistoide, oftalmia simpática, escleritis, retinitis pigmentaria, degeneración macular, incluyendo la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) y la degeneración macular juvenil, incluyendo la enfermedad de Best, la degeneración macular viteliforme de Best la enfermedad de Stargardt, el síndrome de Usher, la distrofia retiniana en panel de Doyme, la distrofia macular de Sorby, la retinosquiasis juvenil, la distrofia de los conos rojos, la distrofia corneal, la distrofia de Fuch, la amaurosis congénita de Leber, la neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON), el síndrome de Adie, la enfermedad de Oguchi, la enfermedad degenerativa del fondo de ojo, traumatismo ocular, inflamación ocular causada por infección, vítreo-reinopatías proliferativas, neuropatía óptica isquémica aguda, cicatrización excesiva, p.ej., tras una operación de filtración para glaucoma, reacción contra implantes oculares, rechazo del injerto de trasplante corneal y otras enfermedades oftálmicas, tales como el edema macular diabético, la oclusión de la vena retiniana, la distrofia retiniana asociada a RLBP1, la coroideremia y la acromatopsia.

Enfermedades neurológicas y neurodegenerativas, incluyendo la enfermedad de Parkinson, complicaciones y/o efectos secundarios del tratamiento de la enfermedad de Parkinson, complejo de demencia asociado al SIDA o encefalopatía relacionada con el VIH, enfermedad de Devic, corea de Sydenham, enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades, condiciones y trastornos degenerativos del SNC, ictus, síndrome post-polio, trastornos psiquiátricos, mielitis, encefalitis, panencefalitis esclerosante subaguda, encefalomielitis, neuropatía aguda, neuropatía subaguda, neuropatía crónica, enfermedad de Pompe, síndrome de Guillain-Barre, corea de Sydenham, miastenia grave, pseudotumoral cerebral, síndrome de Down, enfermedad de Huntington, compresión del SNC o traumatismo en el SNC, o infecciones del SNC atrofias y distrofias musculares enfermedades, condiciones y trastornos de los sistemas nerviosos central y periférico, enfermedad de las neuronas motoras, incluyendo la esclerosis lateral amiotrófica, la atrofia muscular espinal, lesión por avulsión de la médula espinal.

Otras enfermedades y condiciones, tales como la fibrosis quística, mucopolisacaridosis, incluyendo el síndrome de Sanfilippo A, ADA-SCID, SCID ligada a X, porfiria, hemofilia A, haemofilia B, inflamación post-traumática, hemorragia, coagulación y respuesta de fase aguda, caquexia, anorexia, infección aguda, choque séptico, enfermedades infecciosas, complicaciones o efectos secundarios de la cirugía, trasplante de médula ósea u otras complicaciones y/o efectos secundarios del trasplante, complicaciones y efectos secundarios de la terapia génica, p.ej., debido a infección con un portador vírico, o SIDA, para suprimir o inhibir una respuesta

inmunológica humoral y/o celular, para la prevención y/o el tratamiento del rechazo del injerto en casos de trasplante de células naturales o artificiales, tejidos y órganos, tales como córnea, médula ósea, órganos, lentes, marcapasos, tejido epidérmico natural o artificial.

5 *ARNip, micro-ARN y ARNh*

En otras realizaciones determinadas, el NDI comprende un micro-ARN. Los micro-ARN son un grupo muy grande de ARNs pequeños producidos naturalmente en los organismos, por lo menos algunos de los cuales regulan la expresión de genes diana. Son elementos fundadores de la familia de micro-ARN, *let-7* y *lin-4*. Los genes *let-7* codifican una especie de ARN pequeña y altamente conservada que regula la expresión de genes codificantes de proteína endógenos durante el desarrollo del gusano. Las especies de ARN activas se transcriben inicialmente en forma de un precursor de ~70 nt que se procesa post-transcripcionalmente en una forma madura de ~21 nt. Tanto *let-7* como *lin-4* se transcriben en forma de precursores de horquilla de ARN que son procesados en sus formas maduras por el enzima Dicer.

Además del NDI, el vector puede comprender o codificar además un ARNip, ARNh o ARNh regulado (Dickins et al., Nature Genetics 37: 1289-1295, 2005, Silva et al. Nature Genetics 37:1281-1288, 2005).

El silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS, por sus siglas en inglés) mediado por ARN de doble cadena (ARNdc) es un mecanismo de defensa celular conservado para el control de la expresión de genes foráneos. Se cree que la integración aleatoria de elementos, tales como transposones o virus, causa la expresión de ARNdc que activan la degradación específica de secuencia de ARNm de cadena sencilla homólogo o ARN genómico vírico. El efecto de silenciamiento es conocido como interferencia de ARN (ARNi) (Ralph et al., Nature Medicine 11:429-433, 2005). El mecanismo de ARNi implica el procesamiento de ARNdc largos en ARN dúplex de aproximadamente 21 a 25 nucleótidos (nt). Estos productos se denominan ARNs interfirientes pequeños o ARNs de silenciamiento (ARNip), y son mediadores específicos de secuencia de la degradación del ARNm. En las células de mamífero diferenciadas, el ARNdc >30 pb se ha encontrado que activa la respuesta de interferón, conduciendo a un cierre de la síntesis de proteínas y a la degradación no específica del ARNm (Stark et al., Annu. Rev. Biochem. 67:227-64, 1998). Sin embargo, esta respuesta puede omitirse mediante la utilización de ARNip dúplex de 21 nt (Elbashir et al., EMBO J. Dec 3;20(23):6877-88, 2001, Hutvagner et al., Science.Aug 3, 293(5531):834-8, Pub.elec. 12 de julio, 2001), permitiendo analizar la función génica en células de mamífero en cultivo.

Vectores

Un aspecto de la exposición se refiere a un vector vírico que comprende la secuencia de ácidos nucleicos de la exposición.

Un vector es una herramienta que permite o facilita la transferencia de una entidad de un medio a otro. Según la presente invención, y a título de ejemplo, algunos vectores utilizados en técnicas de ácidos nucleicos recombinantes permiten que entidades tales como un segmento de ácidos nucleicos (p.ej., un segmento de ADN heterólogo, tal como un segmento de ADNc heterólogo) se transfieran al interior de una célula diana. El vector puede servir a los propósitos de mantener el ácido nucleico heterólogo (ADN o ARN) dentro de la célula, o facilitar la replicación del vector que comprende un segmento de ADN o ARN, o la expresión de la proteína codificada por un segmento de ácido nucleico.

Los vectores de la invención pueden ser, por ejemplo, vectores víricos proporcionados con un origen de replicación, opcionalmente un promotor para la expresión de dicho polinucleótido y opcionalmente un regulador del promotor. Los vectores pueden contener uno o más genes marcadores seleccionables (p.ej., un gen de resistencia a la neomicina) y/o genes marcadores trazables (p.ej., un gen codificante de GFP). Pueden utilizarse vectores, por ejemplo, para infectar y/o transducir una célula diana.

El vector de la invención puede utilizarse para replicar el NDI en una célula diana compatible *in vitro*. De esta manera, la exposición proporciona un método para producir proteínas *in vitro* mediante la introducción de un vector de la invención en una célula diana compatible *in vitro* y el cultivo de la célula diana bajo condiciones que resultan en la expresión del NDI. La proteína puede recuperarse a partir de la célula diana mediante métodos bien conocidos de la técnica. Entre las células diana adecuadas se incluyen líneas celulares de mamífero y otras líneas celulares eucarióticas.

El vector puede ser un vector de expresión. Los vectores de expresión indicados en la presente memoria comprenden regiones de secuencias que contienen ácidos nucleicos capaces de ser transcritos. De esta manera, se encuentran incluidas en dicha definición secuencias codificantes de ARNm, ARNt y ARNr. Preferentemente, un vector de expresión comprende un polinucleótido de la exposición operablemente ligado a una secuencia de control que es capaz de proporcionar la expresión de la secuencia codificante por parte de la célula diana.

Vectores víricos

En una realización de la invención, el vector es un vector vírico. Un vector vírico también puede denominarse vector, virión de vector o partícula de vector.

5 En otra realización, el vector vírico se deriva de un retrovirus, adenovirus, virus adenoasociado, virus herpes simplex, virus Vaccinia o baculovirus.

Se anticipa que el sistema de represión de la invención resulta beneficioso para cualquier sistema de vector vírico. El sistema encuentra particular utilidad en donde el nucleótido de interés causa efectos adversos, por ejemplo en la célula de producción de vector vírico o durante el ensamblaje de los viriones.

En otra realización, el retrovirus se deriva de un virus espumoso.

15 En otra realización, el vector retrovírico se deriva de un lentivirus.

En otra realización, el vector lentivírico se deriva de VIH-1, VIH-2, VIS, VIF, VIB, VAIE, VAEC o lentivirus Visna.

Título del vector

20 El experto en la materia entenderá que existen varios métodos diferentes para determinar el título de los vectores víricos. El título con frecuencia se expresa en unidades transductoras/ml (UT/ml). El título puede incrementarse mediante el incremento del número de partículas infecciosas y mediante el incremento de la actividad específica de una preparación del vector.

Vectores retrovíricos y lentivíricos

El vector retrovírico de la presente invención puede derivarse o puede ser derivable de cualquier retrovirus adecuado. Se han identificado varios retrovirus diferentes. Entre los ejemplos se incluyen el virus de la leucemia murina (VLM), el virus de la leucemia de las células T humanas (VCTH), el virus del tumor mamario de ratón (VTMR), el virus del sarcoma de Rous (VSR), el virus del sarcoma de Fujinami (VSFu), el virus de la leucemia murina de Moloney (VLM-Mo), el virus del osteosarcoma murino FBR (VSM FBR), el virus del sarcoma murino de Moloney (VSM-Mo), el virus de la leucemia murina de Abelson (VLM-A), el virus 29 de la mielocitomatosis aviar (MC29) y el virus de la eritroblastosis aviar (VEA). Puede encontrarse una lista detallada de los retrovirus en Coffin et al., "Retroviruses", Cold Spring Harbour Laboratory Press Eds: JM Coffin, SM Hughes, HE Varmus, páginas 758-763, 1997.

Los retrovirus pueden dividirse en términos generales en dos categorías: "simples" y "complejos". Los retrovirus pueden dividirse adicionalmente en siete grupos. Cinco de estos grupos representan retrovirus con potencial oncogénico. Los dos grupos restantes son los lentivirus y los espumavirus. Se proporciona una revisión de estos retrovirus en Coffin et al., *ibid.*, 1997.

La estructura básica de los genomas de retrovirus y lentivirus comparte muchas características comunes, tales como una 5'LTR y una 3'LTR entre las que, o dentro de las cuales, se sitúa una señal de empaquetamiento para permitir el empaquetamiento del genoma, un sitio de unión de cebador, sitios de integración para permitir la integración en un genoma de la célula diana y genes *gag/pol* y *env* codificantes de los componentes de empaquetamiento: estos son los polipéptidos necesarios para el ensamblaje de las partículas víricas. Los lentivirus presentan características adicionales, tales como el gen *rev* y las secuencias RRE en VIH, que permiten la exportación eficiente de los transcritos de ARN del provirus integrado del núcleo al citoplasma de una célula diana infectada.

En los provirus, estos genes están flanqueados en ambos extremos por regiones denominadas repeticiones terminales largas (LTR, por sus siglas en inglés). Las LTR son responsables de la integración provírica y la transcripción. Las LTR también sirven como secuencias de intensificador-promotor y pueden controlar la expresión de los genes víricos.

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

En un vector retrovírico típico de la presente invención, por lo menos parte de una o más regiones codificantes de proteína esenciales para la replicación pueden eliminarse del virus, por ejemplo, *gag/pol* y *env* pueden encontrarse ausentes o no ser funcionales. Lo anterior provoca que el vector vírico sea defectuoso para la replicación.

También pueden sustituirse partes del genoma vírico por una biblioteca codificante de secuencias de unión a ácidos nucleicos de la invención operablemente ligadas a una región de control reguladora y un gen informador en el genoma del vector con el fin de generar un vector que comprende secuencias candidatas de unión a ácidos nucleicos de la invención que sean capaces de transducir una célula no en división diana y/o de integrar su genoma en un genoma del huésped.

- Los lentivirus son parte de un grupo más grande de retrovirus. Puede encontrarse una lista detallada de lentivirus en Coffin et al., "Retroviruses", Cold Spring Harbour Laboratory Press Eds: JM Coffin, SM Hughes, HE Varmus, páginas 758-763, 1997. Brevemente, los lentivirus pueden dividirse en grupos de primates y de no primates. Entre los ejemplos de lentivirus de primates se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el agente causal del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida humana (SIDA) y el virus de la inmunodeficiencia del simio (VIS). El grupo lentivírico de no primates incluye el prototipo "virus lento" Visna/virus Maedi (VMV), así como el virus relacionado de artritis-encefalitis caprina (VAEC), virus de la anemia infecciosa equina (VAIE), virus de la inmunodeficiencia del felino (VIF) y virus de la inmunodeficiencia bovina (VIB).
- La familia de lentivirus difiere de los retrovirus en que los lentivirus poseen la capacidad de infectar tanto células en división como no en división (Lewis et al., EMBO J. 11(8):3053-3058, 1992 y Lewis y Emerman, J. Virol 68 (1):510-516, 1994). En contraste, otros retrovirus, tales como el VLM, son incapaces de infectar las células no en división o las de división lenta, tales como las que constituyen, por ejemplo, el tejido muscular, cerebral, pulmonar y hepático.
- Un vector lentivírico, tal como se utiliza en la presente memoria, es un vector que comprende por lo menos una parte componente derivable de un lentivirus. Preferentemente, esa parte componente participa en los mecanismos biológicos por los que el vector infecta las células, expresa genes o se replica.
- El vector lentivírico puede derivarse de un lentivirus de primate (p.ej., VIH-1) o de un lentivirus de no primate.
- Pueden ser ejemplos de lentivirus de no primate, cualquier miembro de la familia de *lentiviridae* que no infecte naturalmente un primate, y entre ellos pueden incluirse el virus de la inmunodeficiencia del felino (VIF), el virus de la inmunodeficiencia bovina (VIB), el virus de la artritis-encefalitis caprina (VAEC), el virus Visna Maedi (VVM) o el virus de la anemia infecciosa equina (VAIE).
- En términos generales, un sistema de producción de vectores retrovíricos típico implica la separación del genoma vírico respecto de las funciones esenciales de empaquetamiento vírico. Tal como se ilustra en la figura 1, estos componentes se proporcionan a las células de producción en casetes de expresión de ADN separados (alternativamente conocidos como plásmidos, plásmidos de expresión, constructos de ADN o constructos de expresión).
- El genoma del vector comprende el NDI. Los genomas de vector típicamente requieren una señal de empaquetamiento (ψ), un casete de expresión interno que aloja el NDI (opcionalmente), un elemento post-transcripcional (EPR), el 3'ppu y una LTR autoinactivadora (SIN, por sus siglas en inglés). Las regiones R-U5 resultan necesarias para la correcta poliadenilación de tanto el ARN genómico del vector como el ARNm del NDI, así como para el procedimiento de transcripción inversa. El genoma del vector puede incluir opcionalmente un marco de lectura abierta, tal como se indica en el documento nº WO 2003/064665.
- Las funciones de empaquetamiento incluyen los genes *gag/pol* y *env*. Estas resultan necesarias para la producción de partículas de vector por la célula de producción. La provisión de estas funciones en trans respecto al genoma facilita la producción de virus defectuosos para la replicación.
- Los sistemas de producción para los vectores gamma-retrovíricos son típicamente sistemas de 3 componentes que requieren constructos de expresión de genoma, *gag/pol* y *env*. Los sistemas de producción para los vectores lentivíricos basados en VIH-1 adicionalmente requieren el gen accesorio *rev* situado en trans y que el genoma del vector incluya el elemento respondedor a *rev* (RRE). Los vectores lentivíricos basados en el VAIE no requieren *rev* si se encuentra presente un marco de lectura abierta (ORF) (ver el documento nº WO 2003/064665)..
- Habitualmente, tanto el promotor "externo" (que controla el casete de genoma del vector) y el promotor "interno" (que controla el casete del NDI) codificado dentro del casete de genoma del vector son promotores eucarióticos o víricos fuertes, al igual que los que controlan los demás componentes del sistema de vector. Entre los ejemplos de dichos promotores se incluyen los promotores de CMV, EF1a, PGK, CAG, TK, SV40 y ubiquitina. Los promotores 'sintéticos' fuertes, tales como los generados por bibliotecas de ADN (p.ej., el promotor JeT), también pueden utilizarse para controlar la transcripción. Alternativamente, para controlar la transcripción pueden utilizarse promotores específicos de tejido, tales como rodopsina (Rho), rodopsina quinasa (RhoK), gen que contiene caja homeo de conos rojos (CRX), proteína de cremallera de leucinas neural específica de retina (NRL), proteína 2 de la distrofia macular viteliforme (VMD2), tirosina hidroxilasa, promotor de enolasa específica neuronal (NSE), promotor de proteína ácida fibrilar glial específica de astrocitos (GFAP), promotor α 1-antitripsina humana (hAAT), fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK), promotor de proteína de unión a ácidos grasos hepáticos, promotor Flt-1, promotor INF- β , promotor Mb, promotor SP-B, promotor SYN1, promotor WASP, promotor SV40 / hAlb, SV40 / CD43, SV40 / CD45, promotor NSE / RU5', promotor ICAM-2, promotor GPIIb, promotor GFAP, promotor de fibronectina, promotor de endoglina, promotor de elastasa-1, promotor de desmina, promotor CD68, promotor CD14 y promotor B29
- La producción de vectores retrovíricos implica la infección transitoria de las células de producción con estos componentes de ADN o la utilización de líneas celulares productoras estables (LCP), en las que los componentes se

integran dentro del genoma de la célula productora (p.ej., Stewart, H. J., M. A. Leroux-Carlucci, C. J. Sion, K. A. Mitrophanous y P. A. Radcliffe, *Gene Ther.* 16(6): 805-814 pub. elec. 2009 mar. 2005). Un enfoque alternativo es utilizar una célula de empaquetamiento estable (en la que se integran establemente los componentes de empaquetamiento) y después se transfecta transitoriamente con el plásmido genómico del vector según se requiera.

5 Con el fin de generar los vectores víricos de la presente invención, las células de producción deben ser capaces de expresar la proteína de unión a ARN (p.ej., la proteína TRAP). De esta manera, en una realización de la invención, las células de producción expresan establemente el constructo de proteína de unión a ARN (p.ej., TRAP). En otra realización de la invención, las células de producción expresan establemente el constructo de proteína de unión a ARN (p.ej., TRAP). En otra realización de la invención, las células de producción expresan establemente un constructo de proteína de unión a ARN (p.ej., TRAP) y también expresan transitoriamente un constructo de proteína de unión a ARN (p.ej., TRAP).

Debe indicarse que, aunque el sistema TRIP se ha descrito principalmente para producir vectores víricos, pueden aplicarse estrategias análogas a otros vectores víricos.

15 En una realización de la presente invención, el vector vírico se deriva del VAIE. El VAIE presenta la estructura genómica más simple de los lentivirus y resulta particularmente preferente para la utilización en la presente invención. Además de los genes *gag/pol* y *env*, VAIE codifica los tres otros genes: *tat*, *rev* y *S2*. *Tat* actúa como un activador transcripcional de la LTR vírica (Derse y Newbold, *Virology* 194(2):530-536, 1993 y Maury et al., *Virology* 200(2):632-642, 1994) y *rev* regula y coordina la expresión de genes víricos a través de elementos respondedores a *rev* (ERR) (Martarano et al., *J. Virol.* 68(5):3102-3111, 1994). Los mecanismos de acción de estas dos proteínas se cree que son bastante similares a mecanismos análogos en los virus de primate (Martarano et al., *J. Virol.* 68(5):3102-3111, 1994). La función de *S2* es desconocida. Además, una proteína del VAIE, Ttm, se ha identificado que está codificada en el primer exón de *tat* de corte y empalme en la secuencia codificante de *env* al inicio de la proteína transmembranal.

20 En una realización alternativa de la presente invención, el vector vírico se deriva del VIH: VIH difiere de VAIE en que no codifica *S2*, aunque al contrario que el VAIE, codifica *vif*, *vpr*, *vpu* y *nef*.

La expresión "vector retrovírico o lentivírico recombinante" (VRR) se refiere a un vector con suficiente información genética retrovírica para permitir el empaquetamiento de un genoma de ARN, en presencia de los componentes de empaquetamiento, en una partícula vírica capaz de infectar una célula diana. La infección de la célula diana puede incluir la transcripción inversa y la integración en el genoma de la célula diana. El VRR porta secuencias codificantes no víricas que deben ser transportadas por el vector hasta la célula diana. Un VRR no es capaz de replicación independiente para producir partículas retrovíricas infecciosas dentro de la célula diana. Habitualmente, el VRR no presenta un gen *gag/pol* y/o *env* funcional, y/o otros genes esenciales para la replicación.

35 Preferentemente, el vector VRR de la presente invención presenta un genoma vírico mínimo.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "genoma vírico mínimo" se refiere a que el vector vírico ha sido manipulado para eliminar los elementos no esenciales, conservando simultáneamente los elementos esenciales para proporcionar las funcionalidades necesarias para infectar, transducir y transportar una secuencia de nucleótidos de interés hasta una célula diana. Puede encontrarse más información sobre esta estrategia en los documentos nº WO 1998/17815 y nº WO 99/32646. Un vector VAIE mínimo no presenta genes *tat*, *rev* y *S2* y ninguno de estos genes se proporciona *en trans* en el sistema de producción. Un vector VIH mínimo no posee *vif*, *vpr*, *vpu*, *tat* y *nef*.

45 Sin embargo, el plásmido de expresión utilizado para producir el genoma del vector dentro de una célula de producción incluirá secuencias de control regulatorio de la transcripción operablemente ligadas al genoma retrovírico para dirigir la transcripción del genoma en una célula de producción/célula de empaquetamiento. Estas secuencias reguladoras pueden ser las secuencias naturales asociadas a la secuencia retrovírica transcrita, es decir, la región 5' UE, o pueden ser un promotor heterólogo, tal como otro promotor vírico, por ejemplo el promotor del CMV, tal como se comenta posteriormente. Algunos genomas de vector lentivírico requieren secuencias adicionales para la producción vírica eficiente. Por ejemplo, particularmente en el caso del VIH, pueden incluirse secuencias de ERR. Sin embargo, la necesidad de ERR (y la dependencia de *rev* que se proporciona *en trans*) puede reducirse o eliminarse mediante optimización de los codones. Puede encontrarse más información sobre esta estrategia en el documento nº WO 2001/79518.

55 También se conocen secuencias alternativas que realizan la misma función que el sistema *rev/ERR*. Por ejemplo, se encuentra un análogo funcional del sistema *rev/ERR* en el virus del mono Mason-Pfizer. Lo anterior se conoce como el elemento de transporte constitutivo (ETC) y comprende una secuencia de tipo ERR en el genoma que se cree que interactúa con un factor en la célula infectada. El factor celular puede considerarse un análogo de *rev*. De esta manera, el ETC puede utilizarse como una alternativa al sistema *rev/ERR*. Cualesquiera otros equivalentes funcionales que sean conocidos o que estén disponibles en el futuro pueden ser relevantes a la invención. Por ejemplo, también es conocido que la proteína Rex del VLHT-1 pueda sustituir funcionalmente la proteína Rev de VIH-1. *Rev* y ERR pueden estar ausentes o no ser funcionales en el vector para la utilización en los métodos de la presente invención; alternativamente, pueden encontrarse presentes *rev* y ERR o sistema funcionalmente equivalente.

65 *Vectores SIN.*

Los vectores para la utilización en los métodos de la presente invención preferentemente se utilizan en una configuración autoinactivadora (SIN, por sus siglas en inglés), en la que las secuencias víricas de intensificador y promotor han sido delecionadas. Los vectores SIN pueden generarse y transducir células diana no en división *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro* con una eficacia similar a la de los vectores de tipo salvaje. La inactivación transcripcional de la repetición terminal larga (LTR, por sus siglas en inglés) en el provirus SIN debe impedir la movilización por virus competentes para la replicación. Ello también debería permitir la expresión regulada de genes a partir de promotores internos, mediante la eliminación de cualesquiera efectos de acción en cis de la LTR.

A título de ejemplo, se han construido sistemas de vector retrovívico autoinactivador mediante la deleción de los intensificadores transcripcionales o los intensificadores y promotor en la región U3 de la 3'LTR. Tras una ronda de transcripción inversa e integración del vector, se copian estos cambios en ambas regiones LTR, 5' y 3', produciendo un provirus transcripcionalmente inactivo. Sin embargo, cualquier promotor o promotores internos a las LTR en dichos vectores todavía estará transcripcionalmente activo. Se ha utilizado esta estrategia para eliminar efectos de los intensificadores y promotores en las LTR víricas sobre la transcripción a partir de genes introducidos internamente. Entre dichos efectos se incluyen la transcripción o supresión de la transcripción. Esta estrategia también puede utilizarse para eliminar la transcripción cadena abajo desde la 3'LTR hacia el interior del ADN genómico. Lo anterior resulta particularmente importante en la terapia génica humana, en la que resulta importante evitar la activación accidental de cualquier oncogén endógeno. Yu et al., PNAS 83: 3194-98, 1986; Marty et al., Biochimie 72: 885-7, 1990; Naviaux et al., J. Virol. 70: 5701-5, 1990; Iwakuma et al., Virol. 261: 120-32, 1990; Deglon et al., Human Gene Therapy 11: 179-90, 2000. Se describen vectores lentivíricos SIN en las patentes US nº6.924.123 y nº 7.056.699.

Vectores lentivíricos no replicantes.

En el genoma de un vector lentivívico defectuoso para la replicación, pueden mutarse, encontrarse ausentes y/o no ser funcionales las secuencias de *gag/pol* y/o *env*.

En un vector lentivívico típico de la presente invención, puede eliminarse del vector por lo menos parte de una o más regiones codificantes para proteínas esenciales para la replicación vírica. Lo anterior provoca que el vector vírico sea defectuoso para la replicación. También pueden sustituirse porciones del genoma vírico por un nucleótido de interés (NDI) con el fin de generar un vector que comprende un NDI que sea capaz de transducir una célula diana no en división y/o de integrar su genoma en el genoma de la célula diana.

En una realización, los vectores lentivíricos son vectores que no se integran, tal como se indica en los documentos nº WO 2006/010834 y nº WO 2007/071994.

En una realización adicional, los vectores presentan la capacidad de transportar una secuencia carente de, o que no posee, ADN vírico. En una realización adicional, puede utilizarse un dominio de unión heterólogo (heterólogo respecto a *gag*) situado en el ARN que debe administrarse y un dominio de unión afín en Gag o GagPol, a fin de garantizar el empaquetamiento del ARN que debe administrarse. Estos dos vectores se describen en el documento nº WO 2007/072056.

Vectores adenovíricos.

En otra realización de la presente invención, el vector puede ser un vector adenovirus. El adenovirus es un ADN lineal de doble cadena que no se replica a través de un intermediario de ARN. Existen más de 50 serotipos humanos diferentes de adenovirus divididos en 6 subgrupos según su secuencia genética.

Los adenovirus son virus de ADN de doble cadena sin cubierta que son capaces de transducción *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro* en un amplio abanico de tipos celulares de origen humano y no humano. Entre estas células se incluyen células epiteliales de las vías respiratorias, hepatocitos, células musculares, miocitos cardíacos, sinoviocitos, células epiteliales mamarias primarias y células terminalmente diferenciadas tras la mitosis, tales como las neuronas.

Los vectores adenovíricos también son capaces de transducir células no en división. Resulta muy importante para enfermedades tales como la fibrosis quística, en la que las células afectadas en el epitelio pulmonar presentan una renovación lenta. De hecho, actualmente se están realizando varios ensayos que utilizan la transferencia mediada por adenovirus de transportador de la fibrosis quística (CFTR, por sus siglas en inglés) al interior de los pulmones de pacientes adultos afectados de fibrosis quística.

Los adenovirus han sido utilizados como vectores para la terapia génica y para la expresión de genes heterólogos. El genoma de grandes dimensiones (36 kb) puede alojar hasta 8 kb de ADN insertado foráneo y es capaz de replicarse eficientemente en líneas celulares complementarias para producir títulos muy elevados, de hasta 10^{12} unidades transductoras por célula. De esta manera, los adenovirus son los mejores sistemas para estudiar la expresión de genes en células no replicantes primarias.

La expresión de genes víricos o foráneos a partir del genoma del adenovirus no requiere una célula replicante. Los

vectores adenovíricos entran en las células mediante endocitosis mediada por receptores. Una vez dentro de la célula, los vectores adenovíricos se integran raramente en cromosomas del huésped. Por el contrario, funcionan episómicamente (independientemente del genoma del huésped) en forma de un genoma lineal en el núcleo del huésped.

5

Vectores víricos adenoasociados.

Los virus adenoasociados (VAA) son sistemas de vector atractivos para la utilización en la presente invención, ya que presentan una elevada frecuencia de integración y pueden infectar células no en división. Lo anterior los convierte en útiles para el transporte de genes hasta el interior de células de mamífero. El VAA presenta un amplio rango de infectividad de huéspedes. Se proporciona información detallada respecto a la generación y utilización de los vectores VAAr en las patentes US nº 5.139.941 y nº 4.797.368.

10

Los vectores VAA recombinantes han sido utilizados con éxito para la transducción *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* de genes marcadores y de genes implicados en enfermedades humanas.

15

Se han desarrollado determinados vectores VAA que pueden incorporar eficientemente grandes cargas (hasta 8-9 kb). Uno de tales vectores presenta una cápside VAA5 y una ITR VAA2 (Allocca M. et al., J. Clin. Invest. 118: 1955-1964, 2008).

20

Vectores de virus herpes simplex.

El virus herpes simplex (VHS) es un virus de ADN de doble cadena con cubierta que infecta naturalmente las neuronas. Puede alojar grandes secciones de ADN foráneo, lo que lo hace atractivo como sistema vector, y se ha utilizado como vector para la administración génica en neuronas (Manservigiet et al., Open Virol. J. 4:123-156, 2010).

25

La utilización del VHS en procedimientos terapéuticos requiere que las cepas sean atenuadas de manera que no puedan establecer un ciclo lítico. En particular, en el caso de que se utilicen vectores de VHS para la terapia génica en seres humanos, el polinucleótido preferentemente debe insertarse en un gen esencial. Lo anterior se debe a que, si un vector vírico se encuentra con un virus de tipo salvaje, se producirá por recombinación la transferencia de un gen heterólogo al virus de tipo salvaje. Sin embargo, con la condición de que el polinucleótido se inserte en un gen esencial, esta transferencia recombinatoria también deleccionaría el gen esencial en el virus receptor y evitaría la 'fuga' del gen heterólogo hacia la población de virus de tipo salvaje competente para la replicación.

30

Vectores de virus Vaccinia

El vector de la presente invención puede ser un vector de virus Vaccinia, tal como el virus modificado Ankara (VMA) o el virus Vaccinia altamente atenuado (VVAA). Entre las alternativas a los vectores Vaccinia se incluyen los vectores avipox, tales como el virus de la viruela aviar o el virus de la viruela del canario conocido como ALVAC y cepas derivadas de los mismos, que pueden infectar y expresar proteínas recombinantes en células humanas pero que son incapaces de replicarse.

35

40

Vectores baculovirus.

El vector de la presente invención también puede ser un vector baculovirus. La modificación del baculovirus para permitir la expresión de NDI codificados dentro de las células de mamífero es bien conocida de la técnica. Ello puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante la utilización de promotores de mamífero cadena arriba del NDI.

45

Vectores codificantes de múltiples NDI.

En una realización, el vector comprende más de un NDI, en el que uno o más NDI están operablemente ligados al sitio de unión a ácidos nucleicos de la invención.

50

Sitio interno de entrada ribosómica (IRES).

Tal como se ha comentado anteriormente, los vectores de la invención pueden comprender más de un NDI. Con el fin de que se expresen estos nDI, puede haber dos o más unidades de transcripción dentro del genoma del vector, uno para cada NDI. Sin embargo, resulta evidente a partir de la literatura que los vectores retrovíricos alcanzan los títulos más altos y propiedades de expresión génica más potentes en el caso de que se mantengan genéticamente simples (documento nº WO 96/37623; Bowtell et al., J. Virol. 62, 2464, 1988; Correll et al., Blood 84, 1812, 1994; Emerman y Temin, Cell 39, 459, 1984; Ghattas et al., Mol.Cell.Biol. 11, 5848, 1991; Hantzopoulos et al., PNAS 86, 3519, 1989; Hatzoglou et al., J. Biol.Chem 266, 8416, 1991; Hatzoglou et al., J. Biol.Chem. 263, 17798, 1988; Li et al., Hum.Gen.Ther. 3, 381, 1992; McLachlin et al., Virol. 195, 1, 1993; Overell et al., Mol.Cell Biol. 8, 1803, 1988; Scharfman et al., PNAS 88, 4626, 1991; Vile et al., Gene Ther. 1, 307, 1994; Xu et al., Virol. 171, 331, 1989; Yee et al., PNAS 84, 5197, 1987) y por lo tanto resulta preferente utilizar un sitio interno de entrada ribosómica (IRES) para iniciar la traducción de la segunda (y posteriores) secuencias codificantes en un mensaje policistrónico (Adam et al., J.Virol. 65, 4985, 1991).

55

60

65

La inserción de elementos IRES en vectores retrovéricos es compatible con el ciclo de replicación retrovérico y permite la expresión de múltiples regiones codificantes a partir de un único promotor (Adam et al. (tal como anteriormente); Koo et al., *Virology* 186:669-675, 1992; Chen et al., *J. Virol* 67:2142-2148, 1993). Los elementos IRES se observaron por primera vez en los extremos 5' no traducidos de picornavirus, donde estimulan la traducción independiente de cap de proteínas víricas (Jang et al., *Enzyme* 44: 292-309, 1990). En el caso de que estén localizados entre marcos de lectura abierta en un ARN, los elementos IRES permiten una traducción eficiente del marco de lectura abierta cadena abajo mediante la estimulación de la entrada del ribosoma en el elemento IRES seguido del inicio cadena abajo de la traducción.

Se proporciona una revisión de IRES en Mountford y Smith (TIG vol. 11, nº 5:179-184, mayo de 1995). Se conocen varias secuencias de IRES diferentes, incluyendo las del virus de la encefalomiocarditis (VEMC) (Ghattas I.R. et al., *Mol. Cell. Biol.*, 11:5848-5859, 1991; la proteína BiP [Macejak y Sarnow, *Nature* 353:91, 1991]; el gen *Antennapedia* de *Drosophila* (exones d y e) [Oh et al., *Genes & Development*, 6:1643-1653, 1992], así como los presentes en el virus de la poliomielitis (VPV) [Pelletier y Sonenberg, *Nature* 334: 320-325, 1988]; ver también Mountford y Smith, TIG 11, 179-184, 1985].

Los elementos IRES de VP, VEMC y el virus de la enfermedad vesicular porcina se han utilizado anteriormente en vectores retrovéricos (Coffin et al., tal como anteriormente).

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

El IRES o los IRES pueden ser de origen vírico (tales como IRES VEMC, IRES VP o secuencias de tipo VFA 2A (virus de la fiebre aftosa) o de origen celular (tales como IRES FGF2, IRES NRF, IRES Notch 2 o RES EIF4).

Con el fin de que el IRES pueda ser capaz de iniciar la traducción de cada polinucleótido, debe estar localizado entre o antes de los polinucleótidos en el genoma del vector.

Promotor.

La expresión de un NDI puede controlarse utilizando secuencias de control, que incluyen promotores/intensificadores y otras señales de regulación de la expresión. Pueden utilizarse promotores procarióticos y promotores que son funcionales en células eucarióticas. Pueden utilizarse promotores específicos de tejido o promotores específicos de estímulos. También pueden utilizarse promotores quiméricos que comprenden elementos de secuencia de dos o más promotores diferentes.

Son secuencias promotoras adecuadas, promotores fuertes, incluyendo los derivados de los genomas de virus tales como el virus del polio, adenovirus, virus de la viruela aviar, virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus (CMV), retrovirus y virus 40 del simio (SV40) o de promotores de mamífero heterólogos, tales como el promotor actina, EF1a, CAG, TK, SV40, ubiquitina, PGK o promotor de proteína ribosómica. Alternativamente, para controlar la transcripción pueden utilizarse promotores específicos de tejido, tales como rodopsina (Rho), rodopsina quinasa (RhoK), gen que contiene caja homeo de conos rojos (CRX), proteína de cremallera de leucinas neural específica de retina (NRL), proteína 2 de la distrofia macular viteliforme (VMD2), tirosina hidroxilasa, promotor de enolasa específica neuronal (NSE), promotor de proteína ácida fibrilar glial específica de astrocitos (GFAP), promotor α 1-antitripsina humana (hAAT), fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK), promotor de proteína de unión a ácidos grasos hepáticos, promotor Flt-1, promotor INF- β , promotor Mb, promotor SP-B, promotor SYN1, promotor WASP, promotor SV40 / hAlb, SV40 / CD43, SV40 / CD45, promotor NSE / RU5', promotor ICAM-2, promotor GPIIb, promotor GFAP, promotor de fibronectina, promotor de endoglina, promotor de elastasa-1, promotor de desmina, promotor CD68, promotor CD14 y promotor B29

La transcripción de un gen puede incrementarse adicionalmente mediante la inserción de una secuencia intensificadora en el vector. Los intensificadores son relativamente independientes de la orientación y la posición; sin embargo, puede utilizarse un intensificador procedente de un virus de célula eucariótica, tal como el intensificador del SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100 a 270) y el intensificador del promotor temprano del CMV. El intensificador puede cortarse y empalmarse en el vector en una posición 5' o 3' respecto al promotor, aunque preferentemente se localiza en un sitio situado en el lado 5' del promotor.

El promotor puede incluir adicionalmente características para garantizar o incrementar la expresión en una célula diana adecuada. Por ejemplo, las características pueden ser regiones conservadas, p.ej., una caja Pribnow o una caja TATA. El promotor puede contener otras secuencias que afecten (tal como, que mantengan, potencien o reduzcan) los niveles de expresión de una secuencia de nucleótidos. Entre otras secuencias adecuadas se incluyen el intrón Sh1 o un intrón ADH. Entre otras secuencias se incluyen elementos inducibles, tales como la temperatura, elementos químicos, o elementos inducibles por luz o estrés. Además, pueden encontrarse presentes elementos adecuados para potenciar la transcripción o la traducción.

La interacción de proteína de unión a ARN-sitio de unión (p.ej., TRAP-tbs) puede resultar útil para formar la base para un sistema de represión de proteínas de transgén para la producción de vectores retrovéricos, en el caso de que un promotor constitutivo y/o fuerte, incluyendo un promotor específico de tejido, que controla el transgén resulte deseable y particularmente en el caso de que la expresión de la proteína del transgén en las células de producción conduzca a la reducción de los títulos de vector y/o induzca una respuesta inmunológica *in vivo* debido a la administración del vector vírico de la proteína derivada del transgén. La figura 4 muestra un ejemplo de cómo puede aplicarse lo anterior en su forma preferente.

10 *Secuencia de empaquetamiento.*

Tal como se utiliza en el contexto de la presente invención, la expresión "señal de empaquetamiento", a la que se hace referencia intercambiamente como "secuencia de empaquetamiento" o "sep", se utiliza en referencia a la secuencia de acción en *cis* no codificante necesaria para la encapsidación de cadenas de ARN retrovérico durante la formación de las partículas víricas. En el VIH-1, esta secuencia se ha localizado a loci que se extienden desde cadena arriba del sitio donante de corte y empalme principal (SD) a por lo menos el codón de inicio de *gag*. En el VAIE, la señal de empaquetamiento comprende la región R en la región codificante 5' de Gag.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "señal de empaquetamiento extendida" o "secuencia de empaquetamiento extendida" se refiere a la utilización de secuencias circundantes a la secuencia sep con extensión adicional hacia el interior del gen *gag*. La inclusión de estas secuencias de empaquetamiento adicionales puede incrementar la eficiencia de la inserción del ARN del vector en partículas víricas.

Los determinantes de la encapsidación del ARN del virus de la inmunodeficiencia del felino (VIF) se ha demostrado que son discretos y no continuos, comprendiendo una región en el extremo 5' del ARNm genómico (R-U5) y otra región que se localiza dentro de los 311 nt proximales de *gag* (Kaye et al., J. Virol. 69(10), 6588-92, oct., 1995).

Sistemas y células de producción de vector vírico.

Otro aspecto de la exposición se refiere a un sistema de producción de vectores víricos que comprende un conjunto de secuencias de ácidos nucleicos codificantes de los componentes requeridos para la producción del vector vírico, en el que la secuencia genómica del vector comprende la secuencia de ácidos nucleicos tal como se define en la invención.

"Sistema de producción de vectores víricos" o "sistema de producción de vectores" o "sistema de producción" debe entenderse como un sistema que comprende los componentes necesarios para la producción de vectores víricos.

De acuerdo con lo anterior, el sistema de producción de vectores comprende un conjunto de secuencias de ácidos nucleicos que codifican los componentes necesarios para generar partículas de vector vírico. Una de tales secuencias de ácidos nucleicos puede comprender el gen codificante de una proteína de unión a ARN. En una realización preferente, la proteína de unión a ARN es TRAP bacteriano.

En una realización de la invención, el vector vírico es un vector retrovérico y el sistema de producción de vectores víricos comprende además secuencias de ácidos nucleicos codificantes de las proteínas Gag y Gag/Pol y la proteína Env, o sustitutos funcionales de las mismas, y la secuencia genómica del vector que comprende el sitio de unión de la presente invención. El sistema de producción puede comprender opcionalmente una secuencia de ácidos nucleicos codificante de la proteína Rev.

En otra realización del sistema de producción de vectores víricos de la invención, el vector vírico se deriva de un retrovirus, adenovirus o virus adenoasociado.

En otra realización, el vector vírico se deriva de un lentivirus. En otra realización, el vector vírico se deriva de VIH-1, VIH-2, VIS, VIF, VIB, VAIE, VAEC o lentivirus Visna.

Otro aspecto de la exposición se refiere a constructos de ADN para la utilización en el sistema de producción de vectores víricos de la exposición. Dichos constructos de ADN (p.ej., plásmidos) pueden incluir el constructo de genoma del vector que comprende la secuencia de ácidos nucleicos de la exposición.

Un aspecto adicional de la exposición se refiere a un constructo de ADN para la utilización en el sistema de producción de vectores víricos de la exposición, que comprende la secuencia de ácidos nucleicos codificante de la proteína de unión a ARN de la exposición, por ejemplo, TRAP.

Otro aspecto de la exposición se refiere a un conjunto de constructos de ADN para la utilización en el sistema de producción de vectores víricos de la exposición, que comprende los constructos de ADN de la exposición y constructos de ADN codificantes de las proteínas Gag y Gag/Pol y la proteína Env, o sustitutos funcionales de las mismas.

En una realización de la exposición, el conjunto de constructos de ADN comprende adicionalmente un constructo de ADN codificante de la proteína de unión a ARN, por ejemplo TRAP.

- 5 En una realización de la exposición, el conjunto de constructos de ADN comprende adicionalmente un constructo de ADN codificante de la proteína Rev o un sustituto funcional de la misma.

Otro aspecto de la exposición se refiere a una célula de producción de vectores víricos que comprende la secuencia de ácidos nucleicos, el sistema de producción de vectores víricos, o algunos o todos los constructos de ADN de la exposición.

Una "célula de producción de vector vírico" debe entenderse como una célula que es capaz de producir un vector vírico o partícula de vector vírico. Las células de producción de vector vírico pueden ser "células productoras" o "células de empaquetamiento". Uno o más constructos de ADN del sistema de vector vírico pueden integrarse establemente o mantenerse episómicamente dentro de la célula de producción de vector vírico. Alternativamente, todos los componentes de ADN del sistema de vector vírico pueden transfectarse transitoriamente en la célula de producción de vector vírico. En todavía otra alternativa, una célula de producción que expresa establemente algunos de los componentes pueden transfectarse transitoriamente con los componentes restantes.

20 El casete de expresión de ADN codificante de la proteína de unión a ARN (p.ej., TRAP) puede integrarse establemente o mantenerse episómicamente dentro de la célula de producción de vector vírico. Alternativamente, el casete de expresión de ADN codificante de la proteína de unión a ARN (p.ej., TRAP) puede transfectarse transitoriamente en la célula de producción de vector vírico.

25 De esta manera, en una realización de la invención, las células de producción expresarán establemente la proteína de unión a ARN (p.ej., TRAP). En otra realización de la invención, las células de producción expresan establemente el constructo de proteína de unión a ARN (p.ej., TRAP).

El nivel de represión requerido puede variar según el NDI; de esta manera, el nivel de proteína de unión a ARN (p.ej., TRAP) requerido en la célula de producción también puede depender del NDI. Bajo algunas circunstancias, por lo tanto, puede desearse una combinación de expresión estable y transitoria de proteína de unión a ARN (p.ej., TRAP). La expresión estable puede proporcionar un nivel continuo de expresión de proteína de unión a ARN en la célula de producción, mientras que la expresión transitoria puede proporcionar a más corto plazo, niveles incrementados de expresión de proteína de unión a ARN. Por ejemplo, resulta posible que la represión de transgenes más problemáticos/tóxicos se beneficiará tanto de niveles preexistentes (p.ej., proporcionados por la expresión estable) como niveles elevados de proteína de unión a ARN durante la producción de vector.

De esta manera, en otra realización de la invención, las células de producción expresarán establemente una proteína de unión a ARN (p.ej., TRAP) y también expresarán transitoriamente un constructo de proteína de unión a ARN (p.ej., TRAP). La expresión transitoria puede proporcionar niveles más elevados a corto plazo de expresión de proteína de unión a ARN que la proporcionada por la expresión estable.

Por "expresión estable" debe entenderse que la expresión de la proteína de unión a ARN a partir del constructo que proporciona la expresión estable no varía sustancialmente durante un periodo de tiempo prolongado.

Por "expresión transitoria" debe entenderse que la expresión de la proteína de unión a ARN a partir del constructo que proporciona la expresión transitoria no es estable durante un periodo de tiempo prolongado. Preferentemente, el polinucleótido codificante de la proteína de unión a ARN que proporciona la expresión transitoria no se integra en el genoma de la célula de producción y no se mantiene episómicamente en la célula de producción.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "célula de empaquetamiento" se refiere a una célula que contiene los elementos necesarios para la producción de partículas de vector infecciosas pero que no poseen el genoma del vector. Típicamente, dichas células de empaquetamiento contienen uno o más casetes de expresión que son capaces de expresar proteínas estructurales víricas (tales como *gag*, *gag/pol* y *env*).

Las células productoras/células de empaquetamiento pueden ser de cualquier tipo celular adecuado. Las células productoras generalmente son células de mamífero aunque pueden ser, por ejemplo, células de insecto.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "célula productora/de producción" o "célula productora/de producción de vector" se refiere a una célula que contiene todos los elementos necesarios para la producción de partículas de vector retrovírico y para la expresión de la proteína de unión a ARN (p.ej., TRAP).

La célula productora puede ser una línea celular productora estable o derivada transitoriamente.

65 En una realización de la invención, las secuencias de nucleótidos de cubierta y nucleocápside, proteína de unión a ARN (p.ej., TRAP) y, en caso de estar presente, rev, están establemente integrados en la célula productora y/o de

empaquetamiento. Sin embargo, una o más cualesquiera de estas secuencias también puede existir en forma episómica y la expresión génica podría producirse a partir del episoma, o podría transfectarse transitoriamente en la célula de producción.

5 Las células de producción de vector pueden ser células de cultivo *in vitro*, tales como una línea celular de cultivo de tejido. Entre las líneas celulares adecuadas se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, células de mamífero, tales como líneas celulares derivadas de fibroblastos murinos o líneas celulares humanas. Preferentemente, las células de producción de vector se derivan de una línea celular humana.

10 En una realización, los vectores de la presente invención utilizan como su sistema de producción, cuatro unidades de transcripción, que expresan un genoma del vector que comprende el sitio de unión de la invención operablemente ligado con el NDI, los componentes gag-pol, una cubierta y la proteína de unión a ARN (p.ej., TRAP). El casete de expresión de la cubierta puede incluir varias cubiertas heterólogas, tales como VEV-G. Opcionalmente, también puede incluirse el componente *rev*.

15 Procedimientos de producción de vector vírico.

Otro aspecto de la exposición se refiere a un procedimiento para producir vectores víricos, que comprende introducir la secuencia de ácidos nucleicos, el sistema de producción de vectores víricos, o algunos o todos los constructos de ADN de la exposición en una célula de producción de vector vírico y cultivar la célula de producción bajo condiciones adecuadas para la producción de los vectores víricos.

20 Las "células de producción" adecuadas son aquellas células que son capaces de producir vectores víricos o partículas de vector vírico al cultivarlas bajo las condiciones apropiadas. Generalmente son células de mamífero o humanas, por ejemplo, células HEK293T, HEK293, CAP, CAP-T o CHO, aunque pueden ser, por ejemplo, células de insecto, tales como células SF9.

25 Las células de producción también pueden ser células de ave, por ejemplo células EB66® (Sigma). Las células de ave pueden resultar particularmente útiles para la producción de vacunas basadas en virus humanos y veterinarios, por ejemplo las vacunas de virus influenza y de enfermedad de Newcastle.

Los métodos para introducir ácidos nucleicos en células de producción son bien conocidos de la técnica y han sido descritos anteriormente.

35 En una realización, la célula de producción comprende la proteína de unión a ARN (p.ej., la proteína de atenuación de la unión a ARN del triptófano, TRAP).

Otro aspecto de la exposición se refiere a un vector vírico producido mediante el sistema de producción de vectores víricos de la exposición, utilizando la célula de producción de vector vírico de la exposición o mediante el procedimiento de la exposición.

40 En una realización, la partícula de vector vírico comprende el sitio de unión de ácidos nucleicos. La partícula de vector vírico puede derivarse de un retrovirus, adenovirus o virus adenoasociado. La partícula de vector retrovírico puede derivarse de un lentivirus. La partícula de vector lentivírico se deriva de VIH-1, VIH-2, VIS, VIF, VIB, VAIE, VAEC o lentivirus Visna.

Los métodos para generar vectores lentivíricos y en particular el procesamiento de vectores lentivíricos son tal como se describen en el documento nº WO 2009/153563.

50 Otro aspecto de la invención se refiere a una célula transducida por el vector vírico de la invención.

Una "célula transducida por una partícula de vector vírico" debe entenderse como una célula, en particular una célula diana, a la que se ha transferido el ácido nucleico que transporta la partícula de vector vírico.

55 *Pseudotipado.*

En un aspecto preferente, el vector vírico de la presente invención ha sido pseudotipado. A este respecto, el pseudotipado puede proporcionar una o más ventajas. Por ejemplo, el producto del gen *env* de los vectores basados en VIH restringiría estos vectores a la infección de únicamente células que expresan una proteína denominada CD4.

60 Sin embargo, en el caso de que el gen *env* en estos vectores haya sido sustituido por secuencias de *env* procedentes de otros virus con cubierta, podría presentar un espectro infeccioso más amplio (Verma y Somia, Nature 389(6648):239-242, 1997). A título de ejemplo, algunos trabajadores han pseudotipado un vector basado en VIH con la glucoproteína de VEV (Verma y Somia, Nature 389(6648):239-242, 1997).

65 En otra alternativa, la proteína Env puede ser una proteína Env modificada, tal como una proteína Env mutante o manipulada. Pueden realizarse modificaciones o seleccionarse para introducir capacidad de reconocimiento o para

reducir la toxicidad o con otro propósito (Valesia-Wittman et al., J. Virol. 70: 2056-64, 1996; Nilson et al., Gene Ther. 3(4):280-286, 1996 y Fielding et al., Blood 91(5):1802-1809, 1998 y referencias citadas en las mismas).

El vector puede pseudotiparse con cualquier molécula de elección.

VEV-G.

La glucoproteína de cubierta (G) del virus de la estomatitis vesicular (VEV), un rhabdovirus, es una proteína de cubierta que se ha demostrado que es capaz de pseudotipar determinados virus de cubierta y viriones de vector vírico.

Su capacidad de pseudotipar vectores retrovéricos basados en el virus de la leucemia murina de Moloney (VLM) en ausencia de cualquier proteína de cubierta retrovívica fue demostrada por primera vez por Emi et al., Journal of Virology 65:1202-1207, 1991. El documento nº WO 1994/294440 enseña que los vectores retrovéricos pueden ser pseudotipados con éxito con VEV-G. Estos vectores VEV-G pseudotipados pueden utilizarse para transducir un amplio abanico de células de mamífero. Más recientemente, Abe et al., J. Virol. 72(8):6356-6361, 1998, enseñan que las partículas retrovéricas no infecciosas pueden convertirse en infecciosas mediante la adición de VEV-G.

Burns et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:8033-7, 1993, han pseudotipado con éxito el retrovirus VLM con VEV-G y ello ha resultado en un vector que presenta un rango de huéspedes alterado en comparación con el VLM en su forma nativa. Los vectores pseudotipados de VEV-G han demostrado que infectan no sólo las células de mamífero, sino también líneas celulares derivadas de peces, reptiles e insectos (Burns et al., Ibid., 1993). También han demostrado ser más eficientes que las cubiertas anfotrópicas tradicionales para una diversidad de líneas celulares (Yee et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:9564-9568, 1994; Emi et al. Journal of Virology 65:1202-1207, 1991. La proteína VEV-G puede utilizarse para pseudotipar determinados retrovirus debido a que su cola citoplasmática es capaz de interactuar con los núcleos retrovéricos.

La provisión de una cubierta de pseudotipado no retrovívica, tal como la proteína VEV-G, proporciona la ventaja de que las partículas de vector pueden concentrarse hasta un título elevado sin pérdida de infectividad (Akkina et al., J. Virol. 70:2581-5, 1996). Las proteínas de cubierta de los retrovirus aparentemente son incapaces de resistir las fuerzas de cizalla durante la ultracentrifugación, probablemente porque consisten en dos subunidades unidas no covalentemente. La interacción entre las subunidades podría romperse en la centrifugación. En contraste, la glucoproteína del VEV está compuesta de una única unidad. Por lo tanto, el pseudotipado con proteína VEV-G puede ofrecer ventajas potenciales.

El documento nº WO 2005/52188 describe la generación de vectores retrovéricos pseudotipados, de líneas celulares productoras estables, con proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VEV-G) como proteína de cubierta vírica asociada a la membrana, y proporciona una secuencia génica para la proteína VEV-G.

Virus del río Ross.

La cubierta del virus del río Ross se ha utilizado para pseudotipar un vector lentivírico de no primate (VIF) y, tras la administración sistémica, ha transducido predominantemente el hígado (Kang et al., J. Virol. 76(18):9378-9388, 2002). Se ha informado de que la eficiencia es 20 veces mayor que la obtenida con el vector pseudotipado con VEV-G, y que causa menos citotoxicidad según se mide mediante los niveles séricos de enzimas hepáticas sugestivos de hepatotoxicidad.

GP64 baculovírico.

La proteína GP64 de baculovirus se ha demostrado que es una alternativa a VEV-G para los vectores víricos utilizados en la producción a gran escala de virus de título elevado requerido para las aplicaciones clínicas y comerciales (Kumar M., Bradow B.P., Zimmerberg J., Hum. Gene Ther. 14(1):67-77, 2003) En comparación con los vectores pseudotipados con VEV-G, los vectores pseudotipados con GP64 presentan un tropismo amplio similar y títulos nativos similares. Debido a que la expresión de GP64 no mata las células, pueden generarse líneas celulares basadas en 293T que expresan constitutivamente GP64.

Cubiertas alternativas.

Entre otras cubiertas que proporcionarán un título razonable al utilizarlas para pseudotipar VAIE se incluyen los virus Mokola, de la rabia, del ébola y VCML (virus de la coriomeningitis linfocítica). La infusión intravenosa en ratones de lentivirus pseudotipados con 4070A condujo a expresión génica máxima en el hígado.

Polinucleótidos.

Los polinucleótidos de la invención pueden comprender ADN o ARN. Pueden ser de cadena sencilla o de doble cadena. El experto en la materia entenderá que numerosos polinucleótidos diferentes pueden codificar el mismo polipéptido como consecuencia de la degeneración del código genético. Además, debe entenderse que el experto en

la materia puede, utilizando técnicas rutinarias, realizar sustituciones de nucleótidos que no afectan a la secuencia polipeptídica codificada por los polinucleótidos de la invención a fin de reflejar el uso de los codones de cualquier organismo huésped particular en el que deben expresarse los polipéptidos de la invención.

5 Los polinucleótidos pueden modificarse mediante cualquier método disponible en la técnica. Tales modificaciones pueden llevarse a cabo con el fin de potenciar la actividad *in vivo* o el periodo de vida de los polinucleótidos de la invención.

10 Algunos polinucleótidos, tales como los polinucleótidos de ADN, pueden producirse recombinantemente, sintéticamente o mediante cualesquiera medios disponibles para el experto en la materia. También pueden clonarse mediante técnicas estándares.

15 Generalmente se producirán polinucleótidos más largos por medios recombinantes, por ejemplo utilizando técnicas de clonación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). Ello implica generar una pareja de cebadores (p.ej., de aproximadamente 15 a 30 nucleótidos) flanqueantes de la secuencia diana que se desea clonar, poniendo en contacto los cebadores con ARNm o ADNc obtenido de una célula animal o humana, realizar una reacción en cadena de la polimerasa bajo condiciones que producirán la amplificación de la región deseada, aislar el fragmento amplificado (p.ej., mediante purificación de la mezcla de reacción con un gel de agarosa) y recuperar el ADN amplificado. Los cebadores pueden diseñarse para que contengan sitios de reconocimiento de enzimas de restricción adecuados de manera que el ADN amplificado pueda clonarse en un vector adecuado.

Proteínas.

25 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "proteína" incluye moléculas polipeptídicas de cadena sencilla, así como complejos de múltiples polipéptidos en los que los polipéptidos constituyentes individuales están unidos por medios covalentes o no covalentes. Tal como se utiliza en la presente memoria, los términos "polipéptido" y "péptido" se refieren a un polímero en el que los monómeros son aminoácidos y se unen entre sí mediante enlaces peptídicos o disulfuro.

30 Variantes, derivados, análogos, homólogos y fragmentos.

Además de las proteínas y nucleótidos específicos mencionados en la presente memoria, la presente invención comprende además la utilización de variantes, análogos, homólogos y fragmentos de los mismos.

35 En el contexto de la presente invención, una variante de cualquier secuencia dada es una secuencia en la que la secuencia específica de residuos (sean residuos aminoácidos o ácidos nucleicos) ha sido modificada de manera que el polipéptido o polinucleótido en cuestión conserva por lo menos una de sus funciones endógenas. Puede obtenerse una secuencia variante mediante adición, delección, sustitución, modificación, reemplazo y/o variación de por lo menos un residuo presente en la proteína de origen natural.

40 El término "variante" tal como se utiliza en la presente memoria, en relación a proteínas o polipéptidos de la presente invención incluye cualquier sustitución, variación, modificación, sustitución, delección o adición de uno (o más) aminoácidos de la secuencia o a la secuencia, con la condición de que la proteína o polipéptido resultante conserve por lo menos una de sus funciones endógenas.

45 El término "análogo" tal como se utiliza en la presente memoria, en relación a polipéptidos o polinucleótidos, incluye cualquier mimético, es decir, un compuesto químico que posee por lo menos una de las funciones endógenas de los polipéptidos o polinucleótidos que mimetiza.

50 Típicamente, pueden realizarse sustituciones de aminoácidos, por ejemplo 1, 2 o 3 a 10 o 20 sustituciones, con la condición de que la secuencia modificada conserve la actividad o capacidad requerida. Las sustituciones de aminoácidos pueden incluir la utilización de análogos de origen no natural.

55 Las proteínas utilizadas en la presente invención pueden presentar además delecciones, inserciones o sustituciones de residuos aminoácidos que producen un cambio silencioso y resultan en una proteína funcionalmente equivalente. Pueden realizarse dichas sustituciones de aminoácidos deliberadas basándose en la similitud de polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad y/o la naturaleza anfipática de los residuos implicados, con la condición de que se conserve la función endógena. Por ejemplo, entre los aminoácidos de carga negativa se incluyen el ácido aspártico y el ácido glutámico; entre los aminoácidos de carga positiva se incluyen la lisina y la arginina; entre los aminoácidos con grupos de cabeza polar sin carga que presentan valores de hidrofiliidad similares se incluyen asparagina, glutamina, serina, treonina y tirosina.

60 Pueden realizarse sustituciones conservadoras, por ejemplo de acuerdo con la tabla a continuación. Los aminoácidos en el mismo bloque en la segunda columna y preferentemente en la misma línea en la tercera columna pueden sustituirse entre ellos.

ALIFÁTICOS	No polares	G A P
		I L V
	Polares - sin carga	C S T M
		N Q
	Polares - con carga	D E
K R H		
F W Y		
AROMÁTICOS		

El término "homólogo" se refiere a una entidad que presenta una determinada homología con la secuencia de aminoácidos de tipo salvaje y la secuencia de nucleótidos de tipo salvaje. El término "homología" puede considerarse equivalente a "identidad".

5 En el presente contexto, se considera que una secuencia homóloga incluye una secuencia de aminoácidos que puede ser por lo menos 50%, 55%, 65%, 75%, 85% o 90% idéntica, preferentemente por lo menos 95% o 97% o 99% idéntica a la secuencia de la invención. Típicamente, los homólogos comprenderán los mismos sitios activos, etc., que la secuencia de aminoácidos de la invención. Aunque la homología también puede considerarse en términos de similitud (es decir, residuos aminoácidos que presentan propiedades/funciones químicas similares), en el contexto de la presente invención, resulta preferente expresar la homología en términos de identidad de secuencias.

10 En el presente contexto, se considera que una secuencia homóloga incluye una secuencia de aminoácidos que puede ser por lo menos 50%, 55%, 65%, 75%, 85% o 90% idéntica, preferentemente por lo menos 95% o 97% o 99% idéntica a la secuencia de la invención. Aunque la homología también puede considerarse en términos de similitud, en el contexto de la presente invención resulta preferente expresar la homología en términos de identidad de secuencias.

15 Pueden llevarse a cabo comparaciones de homología visualmente, o más habitualmente, con ayuda de programas de comparación de secuencias fácilmente disponibles. Estos programas informáticos comercialmente disponibles pueden calcular el porcentaje de homología o identidad entre dos o más secuencias.

20 El porcentaje de homología puede calcularse en secuencias contiguas, es decir, se alinea una secuencia con la otra secuencia y se compara directamente cada aminoácido en una secuencia con el aminoácido correspondiente en la otra secuencia, residuo a residuo. Esto se denomina alineación "sin huecos". Típicamente, dichas alineaciones sin huecos se llevan a cabo únicamente a lo largo de un número relativamente corto de residuos.

25 Aunque éste es un método muy simple y consistente, no tiene en consideración que, por ejemplo, en una pareja de otro modo idéntica de secuencias, una inserción o delección en la secuencia de nucleótidos puede causar que los codones siguientes se desalineen, resultando potencialmente de esta manera en una gran reducción del porcentaje de homología al realizar una alineación global. En consecuencia, la mayoría de métodos de comparación de secuencias se diseñan para producir alineaciones óptimas que tienen en consideración las posibles inserciones y delecciones sin penalizar indebidamente la puntuación global de homología. Ello se consigue insertando "huecos" en la alineación de secuencias para intentar maximizar la homología local.

30 Sin embargo, estos métodos más complejos asignan "penalizaciones de hueco" a cada hueco que se produce en la alineación de manera que, para el mismo número de aminoácidos idénticos, una alineación de secuencias con el menor número posible de huecos, que refleja el mayor grado de relación entre las dos secuencias comparadas, conseguirá una puntuación más alta que una con muchos huecos. Típicamente se utilizan "costes de hueco afín" que cargan un coste relativamente elevado a la existencia de un hueco y una penalización más pequeña a cada residuo posterior en el hueco. Este es el sistema de puntuación de huecos utilizado más comúnmente. Las penalizaciones de hueco elevadas evidentemente producen alineaciones optimizadas con menos huecos. La mayoría de programas de alineación permiten modificar las penalizaciones de hueco. Sin embargo, resulta preferente utilizar los valores por defecto al utilizar dicho software para las comparaciones de secuencias. Por ejemplo, al utilizar el paquete GCG Wisconsin Bestfit, la penalización de hueco por defecto para las secuencias de aminoácidos es -12 para un hueco y de -4 para cada extensión.

35 Por lo tanto, el cálculo del porcentaje máximo de homología en primer lugar requiere la producción de una alineación óptima, que tiene en consideración las penalizaciones de hueco. Un programa informático adecuado para llevar a cabo dicha alineación es el paquete GCG Wisconsin Bestfit (University of Wisconsin, U.S.A.; Devereux et al. Nucleic Acids Research 12:387, 1984). Entre los ejemplos de otro software que puede llevar a cabo comparaciones de secuencia se incluyen, aunque sin limitación, el paquete BLAST (ver Ausubel et al., *Ibid*, cap. 18, 1999), FASTA (Altschul et al., J. Mol. Biol. 403-410, 1990) y el grupo GENWORKS de herramientas de comparación. Tanto BLAST como FASTA se encuentran disponibles para búsquedas fuera de línea y en línea (ver Ausubel et al., *Ibid*, páginas 7-58 a 7-60, 1999). Sin embargo, para algunas aplicaciones, resulta preferente utilizar el programa GCG Bestfit. Otra herramienta, denominada BLAST 2 Sequences, también se encuentra disponible para comparar secuencias de proteínas y de nucleótidos (ver FEMS Microbiol. Lett. 174(2):247-50, 1999; FEMS Microbiol. Lett. 177(1): 187-8, 1999).

Aunque el porcentaje final de homología puede medirse en términos de identidad, el procedimiento de alineación

5 mismo típicamente no se basa en comparaciones de parejas de todo-o-nada. Por el contrario, generalmente se utiliza una matriz de puntuaciones de similitud escalada que asigna puntuaciones a cada comparación entre parejas basándose en la similitud química o la distancia evolutiva. Un ejemplo de dicha matriz utilizada comúnmente es la matriz BLOSUM62, la matriz por defecto para el grupo BLAST de programas. Los programas del GCG Wisconsin generalmente utilizan los valores por defecto públicos o una tabla personalizada de comparación de símbolos si se suministra (ver el manual para el usuario para más información). Para algunas aplicaciones, resulta preferente utilizar los valores por defecto públicos para el paquete de GCG, o en el caso de otro software, la matriz por defecto, tal como BLOSUM62.

10 Una vez el software ha producido una alineación óptima, resulta posible calcular el porcentaje de homología, preferentemente el porcentaje de identidad de secuencias. El software típicamente hace lo anterior como parte de la comparación de las secuencias y genera un resultado numérico.

15 Los "fragmentos" también son variantes y el término se refiere típicamente a una región seleccionada del polipéptido o polinucleótido que resulta de interés funcionalmente o, por ejemplo, en un ensayo. De esta manera, "fragmento" se refiere a una secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos que es una parte de un polipéptido o polinucleótido de longitud completa.

20 Dichas variantes pueden prepararse utilizando técnicas estándares de ADN recombinante, tales como la mutagénesis dirigida a sitio. En el caso de que se deban realizar inserciones, puede producirse ADN sintético codificante de la inserción junto con regiones 5' y 3' flanqueantes correspondientes a la secuencia natural en cada lado del sitio de inserción. Las regiones flanqueantes contendrán sitios de restricción convenientes correspondientes a sitios en la secuencia de origen natural de manera que la secuencia pueda cortarse con el enzima o enzimas apropiados y ligarse el ADN sintético en el corte. A continuación, se expresa el ADN de acuerdo con la invención para producir la proteína codificada. Estos métodos son sólo ilustrativos de las numerosas técnicas estándares conocidas de la técnica para la manipulación de las secuencias de ADN y también pueden utilizarse otras técnicas conocidas.

25 Todas las variantes, fragmentos u homólogos de la proteína de unión a ARN conservarán la capacidad de unirse al sitio de unión afin de la invención, de manera que la traducción del NDI resulte reprimida o bloqueada en una célula de producción de vector vírico.

30 Todas las variantes, fragmentos u homólogos del sitio de unión de la invención conservarán la capacidad de unirse a la proteína de unión a ARN afin, de manera que la traducción del NDI resulte reprimida o bloqueada en una célula de producción de vector vírico.

35 *Optimización de codones.*

40 Los polinucleótidos de la invención utilizados en la presente invención (incluyendo el NDI y/o componentes del sistema de producción del vector) pueden optimizarse para sus codones. La optimización de codones se ha descrito anteriormente, en los documentos nº WO 1999/41397 y nº WO 2001/79518. Las diferentes células difieren en su uso de codones particulares. Este sesgo de codones corresponde a un sesgo en la abundancia relativa de ARNt particulares en el tipo celular. Mediante la alteración de los codones en la secuencia de manera que se ajustan para corresponder con la abundancia relativa de los ARNt correspondientes, resulta posible incrementar la expresión. De la misma manera, resulta posible reducir la expresión seleccionando deliberadamente los codones para los que se conoce que los ARNt correspondientes son raros en el tipo celular particular. De esta manera, se dispone de un grado adicional de control de la traducción.

45 Muchos virus, incluyendo el VIH y otros lentivirus, utilizan un gran número de codones raros y mediante la modificación de ellos para que correspondan con los codones de mamífero utilizados comúnmente, puede conseguirse una expresión incrementada de un gen de interés, p.ej., un NDI o componentes de empaquetamiento en células productoras de mamífero. Las tablas de uso de codones son conocidas de la técnica para las células de mamífero, así como para una diversidad de otros organismos.

50 La optimización de codones de componentes del vector vírico presenta varias otras ventajas. En virtud de las alteraciones en sus secuencias, pueden eliminarse las secuencias de inestabilidad del ARN (INS) en las secuencias de nucleótidos codificantes de los componentes de empaquetamiento de las partículas víricas requeridos para el ensamblaje de las partículas víricas en las células productoras/células de empaquetamiento. Simultáneamente, la secuencia codificante de la secuencia de aminoácidos para los componentes de empaquetamiento se conserva, de manera que los componentes víricos codificados por las secuencias siguen siendo los mismos, o por lo menos son suficientemente similares para que la función de los componentes de empaquetamiento no resulte comprometida. En vectores lentivíricos, la optimización de codones también supera el requisito de Rev/ERR para la exportación, haciendo que las secuencias optimizadas sean independientes de Rev. La optimización de codones también reduce la recombinación homóloga entre diferentes constructos dentro del sistema de vector (por ejemplo, entre las regiones de solapamiento en los marcos de lectura abierta de *gag-pol* y *env*). El efecto global de la optimización de codones, por lo tanto, es un notable incremento del título vírico y una seguridad mejorada.

En una realización, solo los codones relacionados con INS están optimizados para sus codones. Sin embargo, en una realización mucho más preferente y práctica, las secuencias han sido optimizadas para sus codones en su totalidad, con algunas excepciones, por ejemplo las secuencias que comprenden el sitio de desplazamiento de marco de *gag-pol* (ver posteriormente).

El gen *gag-pol* comprende dos marcos de lectura solapantes codificantes de las proteínas de *gag-pol*. La expresión de ambas proteínas depende de un desplazamiento de marco durante la traducción. El desplazamiento de marco se produce como resultado del “deslizamiento” del ribosoma durante la traducción. Este deslizamiento se cree que está causado por lo menos en parte por estructuras secundarias de ARN que hacen que se pare el ribosoma. Dichas estructuras secundarias están presentes cadena abajo del sitio de desplazamiento de marco en el gen *gag-pol*. Para el VIH, la región de solapamiento se extiende entre el nucleótido 1222 cadena abajo del inicio de *gag* (en el que el nucleótido 1 es la A de la ATG de *gag*) hasta el final de *gag* (nt 1503). En consecuencia, un fragmento de 281 pb que comprende el sitio de desplazamiento de marco y la región solapante de los dos marcos de lectura preferentemente no ha sido optimizado para sus codones. La conservación de este fragmento permitirá una expresión más eficiente de las proteínas Gag-Pol.

Para el VAIE, el inicio del solapamiento se considera que es nt 1262 (en donde el nucleótido 1 es la A de la ATG de *gag*). El final del solapamiento se encuentra en 1461 pb. Con el fin de garantizar de que el sitio de desplazamiento de marco y el solapamiento de *gag-pol* se conservan, se ha conservado la secuencia de tipo salvaje entre nt 1156 y 1465.

Pueden realizarse derivaciones respecto del uso óptimo de los codones, por ejemplo con el fin de adaptar sitios de restricción convenientes y pueden introducirse cambios de aminoácidos conservadores en las proteínas Gag-Pol.

En una realización, la optimización de codones se basa en genes de mamífero expresados a nivel bajo. Puede modificarse la tercera y, en ocasiones, la segunda y la tercera bases.

Debido a la naturaleza degenerada del código genético, se apreciará que el experto en la materia podrá conseguir numerosas secuencias de *gag-pol*. Además, existen muchas variantes retrovíricas descritas que pueden utilizarse como un punto de partida para generar una secuencia *gag-pol* de codones optimizados. Los genomas lentivíricos pueden ser bastante variables. Por ejemplo, existen muchas cuasi-especies de VIH-1 que todavía son funcionales. Éste también es el caso para VAIE. Estas variantes pueden utilizarse para potenciar partes particulares del procedimiento de transducción. Pueden encontrarse ejemplos de variantes de VIH-1 en las bases de datos de VIH operados por Los Alamos National Security, LLC en <http://hiv-web.lanl.gov>. Puede encontrarse información sobre los clones de VAIE en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI), en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

La estrategia para optimizar los codones de las secuencias *gag-pol* puede utilizarse para cualquier retrovirus. Lo anterior se aplicaría a todos los lentivirus, incluyendo VAIE, VIF, VIB, VAEC, VMR, VIS, VIH-1 y VIH-2. Además, dicho método podría utilizarse para incrementar la expresión de genes de VLHT-1, VLHT-2, VEH, RVEH y retrovirus endógenos humanos (REH), VLM y otros retrovirus.

La optimización de codones puede convertir la expresión de *gag-pol* en independiente de Rev. Con el fin de permitir la utilización de factores anti-*rev* o ERR en el vector lentivírico, sin embargo, resultaría necesario conseguir que el sistema de generación de vectores víricos sea totalmente independiente de Rev/ERR. De esta manera, el genoma también necesita ser modificado. Ello se consigue optimizando los componentes genómicos del vector. Ventajosamente, dichas modificaciones también conducen a la producción de un sistema más seguro sin todas las proteínas adicionales tanto en el producto como en la célula transducida.

Utilización:

Otro aspecto de la exposición se refiere al vector vírico de la exposición o a una célula o tejido transducido con el vector vírico de la exposición para la utilización en medicina.

Otro aspecto de la exposición se refiere a la utilización del vector vírico de la exposición o a una célula o tejido transducido con el vector vírico de la exposición en medicina.

Otro aspecto de la exposición se refiere a la utilización del vector vírico, una célula de producción de la exposición o una célula o tejido transducido con el vector vírico de la exposición para la preparación de un medicamento para administrar un nucleótido de interés en un sitio diana en necesidad de los mismos.

Dichos usos del vector vírico o célula transducida de la exposición puede ser con fines terapéuticos o diagnósticos, tal como se ha indicado anteriormente.

Vectores terapéuticos.

Vectores terapéuticos retrovíricos.

En una realización, puede utilizarse un vector retrovírico de la invención para introducir los tres genes que codifican tres enzimas de la ruta sintética de la dopamina para tratar la enfermedad de Parkinson. El vector retrovírico es un vector lentivírico mínimo autoinactivador no replicante derivado del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o del virus de la anemia infecciosa equina (VAIE), que puede pseudotiparse con VEV-G o una proteína de cubierta vírica alternativa. Los genes que porta el vector retrovírico pueden comprender una forma truncada del gen de la tirosina hidroxilasa humana (TH*) (sin los 160 aminoácidos N-terminales implicados en la regulación por retroalimentación de TH), la L-aminoácido aromático descarboxilasa humana (AADC, por sus siglas en inglés) y el gen de la GTP-ciclohidrolasa-1 humana (CH1). Los tres enzimas pueden estar codificados por el vector retrovírico en tres marcos de lectura abierta separados. Alternativamente, el vector retrovírico puede codificar una fusión de los enzimas TH y CH1 en un primer marco de lectura abierta y el enzima AADC en un segundo marco de lectura abierta. La expresión de los genes puede estar controlada por un promotor del CMV, y el casete de expresión puede incluir uno o más elementos IRES. El vector retrovírico puede administrarse mediante inyección directa en el cuerpo estriado del cerebro.

En otra realización, puede utilizarse un vector retrovírico de la invención como producto de terapia génica diseñado para introducir el gen MYO7A corrector en fotorreceptores y células epiteliales pigmentarias retinianas (EPR) de soporte y, de esta manera, para atenuar o revertir el deterioro de la visión que se asocia al síndrome de Usher 1B. El vector retrovírico es un vector lentivírico mínimo autoinactivador no replicante derivado del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o del virus de la anemia infecciosa equina (VAIE), que puede pseudotiparse con VEV-G o una proteína de cubierta vírica alternativa. El gen portador por el vector retrovírico es ADNc de MYO7A, que codifica para la proteína MYO7A (un gen grande de más de 100 mb de longitud). La expresión del gen grande MYO7A puede estar controlada por un promotor del CMV, un promotor quimérico CMV/MYO7A o un promotor alternativo. El vector retrovírico puede administrarse mediante inyección subretiniana directa tras vitrectomía del ojo.

En otra realización, puede utilizarse un vector retrovírico de la invención para introducir el gen corrector de casete de unión a ATP, ABCA4 (también conocido como ABCR), en fotorreceptores y, de esta manera, atenuar o revertir la fisiopatología que conduce a la enfermedad de Stargardt. El vector retrovírico es un vector lentivírico mínimo autoinactivador no replicante derivado del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o del virus de la anemia infecciosa equina (VAIE), que puede pseudotiparse con VEV-G o una proteína de cubierta vírica alternativa. El gen que porta el vector retrovírico es ADNc de ABCA4, que codifica para la proteína ABCA4. La expresión del gen ABCA4 puede estar controlada por un promotor del CMV, un promotor específico de fotorreceptores, tal como la rodopsina quinasa, o un promotor alternativo. El vector retrovírico puede administrarse mediante inyección subretiniana directa tras vitrectomía del ojo.

En otra realización, puede utilizarse un vector retrovírico de la invención como producto de terapia génica diseñado para evitar la recurrencia del crecimiento aberrante de los vasos sanguíneos y/o la fuga vascular en los ojos de pacientes con degeneración macular asociada a la edad (DMAE) húmeda, edema macular diabética u oclusión de la vena retiniana, y/o para evitar el crecimiento aberrante de vasos sanguíneos en los ojos de pacientes con degeneración macular asociada a la edad (DMAE) seca. Este vector retrovírico transporta un gen o genes codificantes de una proteína o proteínas antiangiogénicas, tales como la angiostatina y/o la endostatina. El vector retrovírico es un vector lentivírico mínimo autoinactivador no replicante derivado del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o del virus de la anemia infecciosa equina (VAIE), que puede pseudotiparse con VEV-G o una proteína de cubierta vírica alternativa. En una realización, el vector retrovírico expresa los genes humanos de la endostatina y angiostatina en una configuración bicistrónica utilizando un sitio interno de entrada ribosómica (IRES) para la administración en células epiteliales pigmentarias de la retina. La expresión del gen o genes antiangiogénicos puede estar controlada por un promotor del CMV, un promotor específico del EPR, tal como el promotor 2 de la distrofia macular viteliforme (VMD2, por sus siglas en inglés) (más recientemente conocido como el promotor bestrofina) o por un promotor alternativo. El vector retrovírico puede administrarse mediante inyección subretiniana directa tras vitrectomía del ojo.

En otra realización, puede utilizarse un vector retrovírico de la invención como producto de terapia génica diseñado para evitar la recurrencia del crecimiento aberrante de vasos sanguíneos en el edema de los ojos de pacientes con degeneración macular asociada a la edad (DMAE) húmeda. Este vector retrovírico transporta un gen o genes codificantes de una proteína o proteínas antiangiogénicas, tales como la angiostatina y/o la endostatina. El vector retrovírico es un vector lentivírico mínimo autoinactivador no replicante derivado del virus de la anemia infecciosa equina (VAIE), que puede pseudotiparse con VEV-G o una proteína de cubierta vírica alternativa. En una realización, el vector retrovírico expresa los genes humanos de la endostatina y angiostatina en una configuración bicistrónica utilizando un sitio interno de entrada ribosómica (IRES) para la administración en células epiteliales pigmentarias de la retina. La expresión del gen o genes antiangiogénicos puede estar controlada por un promotor del CMV, un promotor específico del EPR, tal como el promotor 2 de la distrofia macular viteliforme (VMD2, por sus siglas en inglés) (más recientemente conocido como el promotor bestrofina) o por un promotor alternativo. El vector retrovírico puede administrarse mediante inyección subretiniana directa tras vitrectomía del ojo.

En otra realización, puede utilizarse un vector retrovírico de la invención como producto de terapia génica diseñado para evitar el rechazo del injerto corneal como resultado de la neovascularización mediante la administración de uno o más genes antiangiogénicos en la córnea del donante antes de la injertación. El vector retrovírico es un vector

lentivírico mínimo autoinactivador no replicante derivado del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o del virus de la anemia infecciosa equina (VAIE), que puede pseudotiparse con VEV-G o una proteína de cubierta vírica alternativa. En una realización, el vector retrovírico expresa uno o más genes antiangiogénicos, tales como los genes humanos de la endostatina y angiostatina en una configuración bicistrónica utilizando un sitio interno de entrada ribosómica (IRES) para la administración *ex vivo* en injertos corneales. El vector retrovírico puede aplicarse en tejido de injerto corneal *ex vivo*, y el tejido donante transducido también puede almacenarse antes del trasplante. La expresión del gen o genes antiangiogénicos puede estar controlada por un promotor constitutivo, tal como el promotor del CMV; sin embargo, también resulta posible utilizar promotores alternativos.

En otra realización, puede utilizarse un vector retrovírico de la invención como terapia génica diseñada para evitar la recurrencia del crecimiento aberrante de los vasos sanguíneos y/o la fuga vascular en los ojos de pacientes con degeneración macular asociada a la edad (DMAE) húmeda, edema macular diabético u oclusión de la vena retiniana, y/o para evitar el crecimiento aberrante de vasos sanguíneos en los ojos de pacientes con degeneración macular asociada a la edad (DMAE) seca. Este vector retrovírico administra un gen codificante de una forma soluble de tirosina quinasa similar a *fms* (Flt-1 soluble). El vector retrovírico es un vector lentivírico mínimo autoinactivador no replicante derivado del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o del virus de la anemia infecciosa equina (VAIE), que puede pseudotiparse con VEV-G o una proteína de cubierta vírica alternativa. La expresión del gen de Flt-1 soluble puede estar controlada por un promotor del CMV, tal como el promotor 2 de la distrofia macular viteliforme (VMD2) (más recientemente conocido como promotor bestrofina) o por un promotor alternativo. El vector retrovírico puede administrarse mediante inyección subretiniana directa tras vitrectomía del ojo.

En otra realización, puede utilizarse un vector retrovírico de la invención como producto de terapia génica diseñado para evitar la recurrencia del crecimiento aberrante de los vasos sanguíneos y/o la fuga vascular en los ojos de pacientes con degeneración macular asociada a la edad (DMAE) húmeda, edema macular diabético u oclusión de la vena retiniana, y/o para evitar el crecimiento aberrante de vasos sanguíneos en los ojos de pacientes con degeneración macular asociada a la edad (DMAE) seca. Este vector retrovírico administra un gen o genes codificantes de la proteína factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF, por sus siglas en inglés). El vector retrovírico es un vector lentivírico mínimo autoinactivador no replicante derivado del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o del virus de la anemia infecciosa equina (VAIE), que puede pseudotiparse con VEV-G o una proteína de cubierta vírica alternativa. La expresión del gen de PEDF puede estar controlado por un promotor del CMV, un promotor específico del EPR, tal como el promotor 2 de la distrofia macular viteliforme (VMD2) (más recientemente conocido como promotor bestrofina) o por un promotor alternativo. El vector retrovírico puede administrarse mediante inyección subretiniana directa tras vitrectomía del ojo.

En otra realización, puede utilizarse un vector retrovírico de la invención como producto de terapia génica diseñado para evitar la recurrencia del crecimiento aberrante de los vasos sanguíneos y/o la fuga vascular en los ojos de pacientes con degeneración macular asociada a la edad (DMAE) húmeda, edema macular diabético u oclusión de la vena retiniana, y/o para evitar el crecimiento aberrante de vasos sanguíneos en los ojos de pacientes con degeneración macular asociada a la edad (DMAE) seca. Este vector retrovírico administra un gen o genes codificantes de un inhibidor del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF, por sus siglas en inglés), tal como un anticuerpo anti-VEGF o fragmento de unión del mismo, un aptámero específico de VEGF o un péptido o polipéptido bloqueante de VEGF, incluyendo, aunque sin limitación, una forma soluble de un receptor de VEGF y/o un inhibidor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), tal como un anticuerpo anti-PDGF o fragmento de unión del mismo, un aptámero específico de PDGF o un péptido o polipéptido bloqueante de PDGF, incluyendo, aunque sin limitación, una forma soluble de un receptor de PDGF. El vector retrovírico es un vector lentivírico mínimo autoinactivador no replicante derivado del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o del virus de la anemia infecciosa equina (VAIE), que puede pseudotiparse con VEV-G o una proteína de cubierta vírica alternativa. En una realización, el vector retrovírico expresa un inhibidor de VEGF y un inhibidor de PDGF en una configuración bicistrónica utilizando un sitio interno de entrada ribosómica (IRES) para la administración en células epiteliales pigmentarias de la retina. La expresión del gen o genes puede estar controlada por un promotor del CMV, un promotor específico del EPR, tal como el promotor 2 de la distrofia macular viteliforme (VMD2) (más recientemente conocido como promotor bestrofina) o por un promotor alternativo. El vector retrovírico puede administrarse mediante inyección subretiniana directa tras vitrectomía del ojo.

En otra realización, puede utilizarse un vector retrovírico de la invención para introducir el gen corrector de la distrofia macular viteliforme 2 (VMD2) y un casete codificante de un micro-ARN (ARNmi) específico para la forma asociada a enfermedad de VMD2, o el gen RDS corrector codificante de periferina-2 y un casete codificante de un ARNm específico para la forma asociada a enfermedad de RDS en células epiteliales pigmentarias retinianas, y de esta manera atenuar o revertir la fisiopatología que conduce a la enfermedad de Best o la degeneración macular viteliforme de Best (BVMD, por sus siglas en inglés). El vector retrovírico es un vector lentivírico mínimo autoinactivador no replicante derivado del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o del virus de la anemia infecciosa equina (VAIE), que puede pseudotiparse con VEV-G o una proteína de cubierta vírica alternativa. La expresión de los genes puede estar controlada por un promotor del CMV, un promotor específico del EPR, tal como el promotor 2 de la distrofia macular viteliforme (VMD2) (más recientemente conocido como promotor bestrofina) o por un promotor alternativo. El vector retrovírico puede administrarse mediante inyección subretiniana directa tras vitrectomía del ojo.

En otra realización, puede utilizarse un vector retrovírico de la invención para introducir el gen corrector de proteína 1

- de unión al retinaldehído, RLBP1, en células epiteliales pigmentarias retinianas y, de esta manera, atenuar o revertir la fisiopatología que conduce a la distrofia retiniana asociada a RLBP1. El vector retrovítico es un vector lentivítico mínimo autoinactivador no replicante derivado del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o del virus de la anemia infecciosa equina (VAIE), que puede pseudotiparse con VEV-G o una proteína de cubierta vírica alternativa. El gen que porta el vector retrovítico es ADNc de RLBP1, que codifica para la proteína RLBP1. La expresión del gen de RLBP1 puede estar controlada por un promotor del CMV, un promotor específico del EPR, tal como el promotor 2 de la distrofia macular viteliforme (VMD2) (más recientemente conocido como promotor bestrofina) o por un promotor alternativo. El vector retrovítico puede administrarse mediante inyección subretiniana directa tras vitrectomía del ojo.
- En otra realización, puede utilizarse un vector retrovítico de la invención como producto de terapia génica diseñado para tratar el glaucoma. Este vector retrovítico administra un gen o genes codificantes de COX-2 y/o receptor de prostaglandina F2 α (FPR) que actúa reduciendo la presión intraocular. El vector retrovítico es un vector lentivítico mínimo autoinactivador no replicante derivado del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o del virus de la anemia infecciosa equina (VAIE), que puede pseudotiparse con VEV-G o una proteína de cubierta vírica alternativa. En una realización, el vector retrovítico expresa los genes de COX-2 y del receptor de prostaglandina F2 α (FPR) en una configuración bicistrónica utilizando un sitio interno de entrada ribosómica (IRES) para la administración en la cámara anterior del ojo. La expresión del gen o genes puede estar controlada por el promotor del CMV o un promotor alternativo. El vector retrovítico puede administrarse mediante inyección transcorneal.
- En otra realización, puede utilizarse un vector retrovítico de la invención para introducir el gen corrector de harmonina para atenuar o revertir la fisiopatología que conduce al síndrome de Usher 1c. El vector retrovítico es un vector lentivítico mínimo autoinactivador no replicante derivado del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o del virus de la anemia infecciosa equina (VAIE), que puede pseudotiparse con VEV-G o una proteína de cubierta vírica alternativa. El gen que porta el vector retrovítico es ADNc de harmonina, que codifica para la proteína harmonina. La expresión del gen de la harmonina puede estar controlada por el promotor del CMV o un promotor alternativo. El vector retrovítico puede administrarse mediante inyección subretiniana directa tras vitrectomía del ojo.
- En otra realización, puede utilizarse un vector retrovítico de la invención para introducir el gen corrector de la proteína Rab escolta 1 (REP1, por sus siglas en inglés) para atenuar o revertir la fisiopatología que conduce a la coroidemia. El vector retrovítico es un vector lentivítico mínimo autoinactivador no replicante derivado del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o del virus de la anemia infecciosa equina (VAIE), que puede pseudotiparse con VEV-G o una proteína de cubierta vírica alternativa. El gen que porta el vector retrovítico es ADNc de REP1, que codifica para la proteína REP1. La expresión del gen REP1 puede estar controlada por el promotor del CMV o un promotor alternativo. El vector retrovítico puede administrarse mediante inyección subretiniana directa tras vitrectomía del ojo.
- En otra realización, puede utilizarse un vector retrovítico de la invención para introducir el gen o genes correctores de canal beta 2 activado por nucleótidos cíclicos (CNGB2, por sus siglas en inglés) y/o el gen o genes del canal alfa 3 activado por nucleótidos cíclicos (CNGA3) en el ojo para atenuar o revertir la fisiopatología que conduce a la acromatopsia. El vector retrovítico es un vector lentivítico mínimo autoinactivador no replicante derivado del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o del virus de la anemia infecciosa equina (VAIE), que puede pseudotiparse con VEV-G o una proteína de cubierta vírica alternativa. El gen o genes portados por el vector retrovítico son el gen CNGB2 y/o el gen CNGA3, que codifican para las proteínas CNGB2 y/o CNGA3. La expresión del gen o genes puede estar controlada por el promotor del CMV o un promotor alternativo. El vector retrovítico puede administrarse mediante inyección subretiniana directa tras vitrectomía del ojo.
- En otra realización, puede utilizarse un vector retrovítico de la invención para introducir el gen corrector de CEP290 en el ojo para atenuar o revertir la fisiopatología que conduce a la amaurosis congénita de Leber (ACL). El vector retrovítico es un vector lentivítico mínimo autoinactivador no replicante derivado del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o del virus de la anemia infecciosa equina (VAIE), que puede pseudotiparse con VEV-G o una proteína de cubierta vírica alternativa. El gen que porta el vector retrovítico es el gen CEP290, que codifica para la proteína centrosómica de 290 kDa. La expresión del gen CEP290 puede estar controlada por el promotor del CMV o un promotor alternativo. El vector retrovítico puede administrarse mediante inyección subretiniana directa tras vitrectomía del ojo.
- En otra realización, puede utilizarse un vector retrovítico de la invención para introducir el gen corrector del regulador de GTPasa (RPGR) de la retinitis pigmentosa en el ojo para atenuar o revertir la fisiopatología que conduce a la retinitis ligada a X. El vector retrovítico es un vector lentivítico mínimo autoinactivador no replicante derivado del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o del virus de la anemia infecciosa equina (VAIE), que puede pseudotiparse con VEV-G o una proteína de cubierta vírica alternativa. El gen que porta el vector retrovítico es ADNc de RPGR, que codifica para la proteína RPGR. La expresión del gen RPGR puede estar controlada por el promotor del CMV o un promotor alternativo. El vector retrovítico puede administrarse mediante inyección subretiniana directa tras vitrectomía del ojo.
- En otra realización, puede utilizarse un vector retrovítico de la invención para introducir el gen corrector de la retinosquisina 1 (RS1) en el ojo para atenuar o revertir la fisiopatología que conduce a la retinosquisis ligada a X. El

vector retrovítico es un vector lentivítico mínimo autoinactivador no replicante derivado del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o del virus de la anemia infecciosa equina (VAIE), que puede pseudotiparse con VEV-G o una proteína de cubierta vírica alternativa. El gen que porta el vector retrovítico es ADNc de RS1, que codifica para la proteína RS1. La expresión del gen RS1 puede estar controlada por el promotor del CMV o un promotor alternativo. El vector retrovítico puede administrarse mediante inyección subretiniana directa tras vitrectomía del ojo.

En otra realización, puede utilizarse un vector retrovítico de la invención para introducir el gen corrector De retinitis pigmentosa 1 (RP1) en el ojo para atenuar o revertir la fisiopatología que conduce a la retinitis pigmentosa. El vector retrovítico es un vector lentivítico mínimo autoinactivador no replicante derivado del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o del virus de la anemia infecciosa equina (VAIE), que puede pseudotiparse con VEV-G o una proteína de cubierta vírica alternativa. El gen que porta el vector retrovítico es ADNc de RP1, que codifica para la proteína RP1. La expresión del gen de RP1 puede estar controlada por un promotor del CMV, un promotor específico de fotorreceptores, tal como la rodopsina quinasa, o un promotor alternativo. El vector retrovítico puede administrarse mediante inyección subretiniana directa tras vitrectomía del ojo.

En otra realización, puede utilizarse un vector retrovítico de la invención para introducir el gen corrector de la proteína de 65 kDa específica del epitelio pigmentario retiniano (RPE65) para atenuar o revertir la fisiopatología que conduce a la amaurosis congénita de Leber (ACL) de tipo 2. El vector retrovítico es un vector lentivítico mínimo autoinactivador no replicante derivado del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o del virus de la anemia infecciosa equina (VAIE), que puede pseudotiparse con VEV-G o una proteína de cubierta vírica alternativa. El gen que porta el vector retrovítico es ADNc de RPE65, que codifica para la proteína RPE65. La expresión del gen de RPE65 puede estar controlado por un promotor específico de EPR, tal como el promotor 2 de la distrofia macular viteliforme (VMD2) (más recientemente conocido como promotor bestrofina) o por un promotor alternativo. El vector retrovítico puede administrarse mediante inyección subretiniana directa tras vitrectomía del ojo.

En otra realización, puede utilizarse un vector retrovítico de la invención para introducir el gen corrector de la proteína rica en prolina/arginina con repeticiones de leucina terminales (PRELP) para atenuar o revertir la fisiopatología que conduce a la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) húmeda, DMAE seca, edema macular diabético u oclusión de la vena retiniana. El vector retrovítico es un vector lentivítico mínimo autoinactivador no replicante derivado del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o del virus de la anemia infecciosa equina (VAIE), que puede pseudotiparse con VEV-G o una proteína de cubierta vírica alternativa. El gen que porta el vector retrovítico es ADNc de PRELP, que codifica para la proteína PRELP. La expresión del gen de PRELP puede estar controlado por un promotor específico de EPR, tal como el promotor 2 de la distrofia macular viteliforme (VMD2) (más recientemente conocido como promotor bestrofina) o por un promotor alternativo. El vector retrovítico puede administrarse mediante inyección subretiniana directa tras vitrectomía del ojo.

En otra realización, puede utilizarse un vector retrovítico de la invención para introducir una secuencia de ácidos nucleicos codificante de un ARNmi específico de miocilina sintético en el ojo para atenuar o revertir la fisiopatología que conduce al glaucoma de ángulo abierto juvenil mediante la inactivación de la expresión de la miocilina. El vector retrovítico es un vector lentivítico mínimo autoinactivador no replicante derivado del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o del virus de la anemia infecciosa equina (VAIE), que puede pseudotiparse con VEV-G o una proteína de cubierta vírica alternativa. La expresión del ARNmi específico de miocilina sintético puede estar controlada por el promotor del CMV o un promotor alternativo. El vector retrovítico puede administrarse mediante inyección subretiniana directa tras vitrectomía del ojo.

En otra realización, puede utilizarse un vector retrovítico de la invención para introducir uno o más enzimas limitantes de la velocidad procedentes de la ruta de biosíntesis del glutatión, glutamato-cisteína ligasa (GCL9 y/o glutatión sintetasa (GSS), y/o una secuencia de ácidos nucleicos codificante de un ARNmi específico de gamma-glutamilttransferasa (GGT) sintético en el ojo para atenuar o revertir la fisiopatología que conduce a retinitis pigmentosa mediante potenciación y/o inactivación génica. El vector retrovítico es un vector lentivítico mínimo autoinactivador no replicante derivado del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o del virus de la anemia infecciosa equina (VAIE), que puede pseudotiparse con VEV-G o una proteína de cubierta vírica alternativa. La expresión del gen GCL y/o GSS y/o ARNmi específico de GGT sintético puede estar controlada por un promotor del CMV o por un promotor alternativo. En una realización, el vector retrovítico puede expresar el gen o genes y/o el ARNmi sintético en una configuración multicistrónica utilizando uno o más sitios internos de entrada ribosómica (IRES). El vector retrovítico puede administrarse mediante administración directa en la cámara anterior del ojo.

En otra realización, puede utilizarse un vector retrovítico de la invención como producto de terapia génica diseñado para tratar trastornos neurodegenerativos, tales como la demencia del lóbulo frontotemporal, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington y los trastornos de las neuronas motoras, tales como la esclerosis lateral amiotrófica (ELA). Este vector retrovítico administra un gen codificante de la proteína VEGF, que puede ser una isoforma A de VEGF, tal como VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, o VEGF₁₈₉; o puede ser VEGF-B, VEGF-C o VEGF-D, presentando dichos genes un efecto neuroprotector. El vector retrovítico es un vector lentivítico mínimo autoinactivador no replicante derivado del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o del virus de la anemia infecciosa equina (VAIE), que puede pseudotiparse con virus G de la rabia o VEV-G o una proteína de cubierta vírica alternativa. La expresión del gen puede estar controlada por el promotor del CMV o un promotor alternativo. El vector

retrovírico puede administrarse mediante inyección directa en grandes grupos musculares o mediante inyección directa en el líquido cefalorraquídeo mediante inyección intratecal o intraventricular.

5 En otra realización, puede utilizarse un vector retrovírico de la invención como producto de terapia génica diseñado para tratar la fibrosis quística. Este vector retrovírico administra un gen codificante del regulador de la conductancia transmembranal de la fibrosis quística (CFTR, por sus siglas en inglés). El vector retrovírico es un vector lentivírico mínimo autoinactivador no replicante derivado del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o del virus de la anemia infecciosa equina (VAIE), que puede pseudotiparse con Flu-HA, F o HN de la cubierta del virus Sendai, virus ébola, GP64 de baculovirus o una proteína de cubierta vírica alternativa. La expresión del gen puede estar controlada por el promotor del CMV o un promotor alternativo. El vector retrovírico puede administrarse por vía intranasal, mediante la utilización de un nebulizador, o mediante administración directa mediante lavado alveolar bronquial en los pulmones.

10 En otra realización, el vector retrovírico de la invención puede utilizarse para introducir el gen o genes correctores de N-sulfoglucosamina sulfohidrolasa (SGSH, por sus siglas en inglés) y/o factor 1 modificador de la sulfatasa (SUMF1) en el cerebro para atenuar o revertir la fisiopatología que conduce al síndrome de Sanfilipo A. El vector retrovírico es un vector lentivírico mínimo autoinactivador no replicante derivado del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o del virus de la anemia infecciosa equina (VAIE), que puede pseudotiparse con VEV-G o una proteína de cubierta vírica alternativa. El gen o genes que porta el vector retrovírico son el ADNc de SGSH, que codifica para la proteína SGSH y/o el gen de SUMF1, que codifica para la proteína SUMF1. La expresión del gen o genes puede estar controlada por el promotor del CMV o un promotor alternativo. En una realización, el vector retrovírico puede expresar los genes SGSH y SUMF1 en una configuración multicistónica utilizando un sitio interno de entrada ribosómica (IRES). El vector retrovírico puede administrarse mediante inyección intracerebral directa.

15 En otra realización, puede utilizarse un vector retrovírico de la invención para introducir el gen corrector de la alfa-glucosidasa ácida (GAA, por sus siglas en inglés) en grandes grupos musculares y/o en los pulmones para atenuar o revertir la fisiopatología que conduce a la enfermedad de Pompe. Este vector retrovírico administra un gen codificante de la proteína GAA. El vector retrovírico es un vector lentivírico mínimo autoinactivador no replicante derivado del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o del virus de la anemia infecciosa equina (VAIE), que puede pseudotiparse con Flu-HA, F o HN de la cubierta del virus Sendai, virus ébola, GP64 de baculovirus, G de la rabia, VEV-G o una proteína de cubierta vírica alternativa. La expresión del gen puede estar controlada por el promotor del CMV o un promotor alternativo. El vector retrovírico puede administrarse mediante (i) inyección directa en grandes grupos musculares y/o (ii) por vía intranasal, mediante la utilización de un nebulizador, o mediante administración directa mediante lavado alveolar bronquial en los pulmones.

20 En otra realización, puede utilizarse un vector retrovírico de la invención *ex vivo* para transducir células T autólogas o alogénicas con una secuencia de ácidos nucleicos codificante de un receptor de antígeno quimérico específico de CD19 (CAR19). Estas células T transducidas se infunden a continuación en el sujeto a fin de tratar cánceres y leucemias que expresan CD19. El vector retrovírico es un vector lentivírico mínimo autoinactivador no replicante derivado del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o del virus de la anemia infecciosa equina (VAIE), que puede pseudotiparse con VEV-G o una proteína de cubierta vírica alternativa. La expresión de la secuencia de ácidos nucleicos codificante de CAR puede estar controlada por el promotor del CMV o un promotor alternativo.

25 En otra realización, puede utilizarse un vector retrovírico de la invención *ex vivo* para transducir células T autólogas o alogénicas con una secuencia de ácidos nucleicos codificante de un receptor de antígeno quimérico específico de 5T4 (CAR). Estas células T transducidas se infunden a continuación en el sujeto a fin de tratar cánceres y leucemias que expresan 5T4. El vector retrovírico es un vector lentivírico mínimo autoinactivador no replicante derivado del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o del virus de la anemia infecciosa equina (VAIE), que puede pseudotiparse con VEV-G o una proteína de cubierta vírica alternativa. La expresión de la secuencia de ácidos nucleicos codificante de CAR 5T4 puede estar controlada por el promotor EF1 α , el promotor del CMV o un promotor alternativo.

30 Tal como conocerá el experto en la materia, pueden producirse receptores de antígeno quiméricos (CAR, por sus siglas en inglés) que son específicos para un abanico de polipéptidos asociados a cáncer o a leucemia. Puede utilizarse un vector retrovírico de la invención *ex vivo* para transducir células T autólogas o alogénicas con una secuencia de ácidos nucleicos codificante de un receptor de antígeno quimérico (CAR) específico para cualquier polipéptido asociado a cáncer o leucemia. A continuación, estas células T transducidas se infunden en el sujeto para tratar cánceres y leucemias que expresan el polipéptido asociado a cáncer o leucemia al que se une el CAR. El vector retrovírico es un vector lentivírico mínimo autoinactivador no replicante derivado del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o del virus de la anemia infecciosa equina (VAIE), que puede pseudotiparse con VEV-G o una proteína de cubierta vírica alternativa. La expresión de la secuencia de ácidos nucleicos codificante de CAR puede estar controlada por el promotor EF1 α , el promotor del CMV o un promotor alternativo. Entre los polipéptidos asociados a cáncer o leucemia adecuados que pueden ser la diana de dichos CAR se incluyen, aunque sin limitación, los siguientes: mesotelina, receptor α del folato, cadena ligera kappa de inmunoglobulina, CD30, antígeno carcinoembrionario (CEA), CD138, gangliósido G2 (GD2), CD33, CD22, receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) tales como EGFR VIII, IL-13R α 2, CD20, ErbBs, tales como Her2, antígeno membranal específico de la próstata (PSMA), antígeno Y de Lewis Y y proteína de activación fibroblástica (FAB).

En otra realización, puede utilizarse un vector retrovítico de la invención *ex vivo* para transducir células T autólogas o alogénicas con una secuencia de ácidos nucleicos codificante de un receptor de células T (TCR) que es específico para un péptido MHC que se expresa sobre células enfermas, leucémicas o cancerosas. A continuación, estas células T transfectadas se infunden en el sujeto para tratar la enfermedad, cáncer o leucemia que está asociada con la expresión del péptido MHC al que se une el TCR. El vector retrovítico es un vector lentivítico mínimo autoinactivador no replicante derivado del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o del virus de la anemia infecciosa equina (VAIE), que puede pseudotiparse con VEV-G o una proteína de cubierta vírica alternativa. La expresión de la secuencia de ácidos nucleicos codificante de TCR puede estar controlada por el promotor EF1 α , el promotor del CMV o un promotor alternativo. Los TCR que están codificados por los vectores de la invención pueden ser TCR de cadena sencilla (TCRsc) o TCR diméricos (TCRd). Tal como conocerá el experto en la materia, entre los TCRd adecuados se incluyen los indicados en el documento n^o WO 2003/020763 y entre los TCRsc adecuados se incluyen los indicados en el documento n^o WO 1999/018129. En aspectos específicos de la presente realización, las células T transfectadas con TCRs pueden utilizarse para tratar el SIDA, la leucemia y cánceres, incluyendo mielomas y sarcomas.

En otra realización, puede utilizarse un vector retrovítico de la invención para tratar el gen que codifica la cadena gamma común (CD132) para tratar la inmunodeficiencia combinada grave (SCID, por sus siglas en inglés) ligada al X. El vector retrovítico es un vector lentivítico mínimo autoinactivador no replicante derivado del virus de la anemia infecciosa equina (VAIE), que puede pseudotiparse con VEV-G o una proteína de cubierta vírica alternativa. La expresión del gen o genes puede estar controlada por el promotor del CMV o un promotor alternativo. El vector retrovítico de la invención puede utilizarse *ex vivo* para transducir células madre de médula ósea. Estas células madre de médula ósea transducidas a continuación pueden infundirse en un sujeto para tratar la enfermedad.

En otra realización, puede utilizarse un vector retrovítico de la invención para tratar el gen que codifica la adenosina desaminasa para tratar la inmunodeficiencia combinada grave (SCID) ADA. El vector retrovítico es un vector lentivítico mínimo autoinactivador no replicante derivado del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o del virus de la anemia infecciosa equina (VAIE), que puede pseudotiparse con VEV-G o una proteína de cubierta vírica alternativa. La expresión del gen o genes puede estar controlada por el promotor del CMV o un promotor alternativo. El vector retrovítico de la invención puede utilizarse *ex vivo* para transducir células madre de médula ósea. Estas células madre de médula ósea transducidas a continuación pueden infundirse en un sujeto para tratar la enfermedad.

En otra realización, el vector retrovítico de la invención puede utilizarse para introducir el gen que codifica la proteína WAS para tratar el síndrome de Wiskott-Aldrich (WAS). El vector retrovítico es un vector lentivítico mínimo autoinactivador no replicante derivado del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o del virus de la anemia infecciosa equina (VAIE), que puede pseudotiparse con VEV-G o una proteína de cubierta vírica alternativa. La expresión del gen o genes puede estar controlada por el promotor del CMV o un promotor alternativo. El vector retrovítico de la invención puede utilizarse *ex vivo* para transducir células madre de médula ósea. Estas células madre de médula ósea transducidas a continuación pueden infundirse en un sujeto para tratar la enfermedad.

En otra realización, puede utilizarse un vector retrovítico de la invención para introducir un gen que codifica un de varias globinas, incluyendo la globina β de tipo salvaje, la globina fetal de tipo salvaje y las globinas "antifalciformes" mutadas para tratar la anemia de células falciformes o la talasemia. Tal como conocerá el experto en la materia, entre los ejemplos de globinas "antifalciformes" se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, las indicadas en los documentos n^o WO 2014/043131 y n^o WO 1996/009385. El vector retrovítico es un vector lentivítico mínimo autoinactivador no replicante derivado del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o del virus de la anemia infecciosa equina (VAIE), que puede pseudotiparse con VEV-G o una proteína de cubierta vírica alternativa. La expresión del gen o genes puede estar controlada por el promotor del CMV o un promotor alternativo. El vector retrovítico de la invención puede utilizarse *ex vivo* para transducir células madre de médula ósea. Estas células madre de médula ósea transducidas a continuación pueden infundirse en un sujeto para tratar la enfermedad.

En otra realización, el vector retrovítico de la invención puede utilizarse para introducir un gen corrector, Factor VIII, en células hepáticas, musculares o adiposas para tratar la hemofilia A. El vector retrovítico es un vector lentivítico mínimo autoinactivador no replicante derivado del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o del virus de la anemia infecciosa equina (VAIE), que puede pseudotiparse con VEV-G o una proteína de cubierta vírica alternativa. El gen transportador por el vector retrovítico es el Factor VIII. La expresión del gen de Factor VIII puede estar controlada por el promotor del CMV o un promotor alternativo.

En otra realización, el vector retrovítico de la invención puede utilizarse para introducir un gen corrector, Factor IX, en células hepáticas, musculares o adiposas para tratar la hemofilia B. El vector retrovítico es un vector lentivítico mínimo autoinactivador no replicante derivado del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o del virus de la anemia infecciosa equina (VAIE), que puede pseudotiparse con VEV-G o una proteína de cubierta vírica alternativa. El gen transportador por el vector retrovítico es el Factor IX. La expresión del gen de Factor IX puede estar controlada por el promotor del CMV o un promotor alternativo.

En otra realización, puede utilizarse un vector retrovítico de la invención para introducir el gen que codifica la alfa-galactosidasa A (α -GAL A) para tratar la enfermedad de Fabry. El vector retrovítico es un vector lentivítico mínimo

autoinactivador no replicante derivado del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o del virus de la anemia infecciosa equina (VAIE), que puede pseudotiparse con VEV-G o una proteína de cubierta vírica alternativa. El gen que porta el vector retrovítico es ADNC de GLA, que codifica para la proteína α -GAL A. La expresión del gen puede estar controlada por un promotor del CMV o por un promotor alternativo. El vector retrovítico de la invención puede utilizarse *ex vivo* para transducir células madre CD34⁺ hematopoyéticas. Estas células madre CD34⁺ hematopoyéticas transducidas a continuación pueden infundirse en un sujeto para tratar la enfermedad.

En otra realización, puede utilizarse un vector retrovítico de la invención para tratar el gen que codifica un enzima deficiente para tratar una forma de porfiria. El vector retrovítico es un vector lentivítico mínimo autoinactivador no replicante derivado del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o del virus de la anemia infecciosa equina (VAIE), que puede pseudotiparse con VEV-G o una proteína de cubierta vírica alternativa. El gen que porta el vector retrovítico es el codificante del enzima defectuoso asociado al tipo de porfiria que debe tratarse, seleccionado de la tabla a continuación. La expresión del gen o genes puede estar controlada por el promotor del CMV o un promotor alternativo.

Tipo de porfiria	Enzima defectuoso
Anemia sideroblástica ligada al X (XLSA)	δ -aminolevulinato (ALA) sintasa
Porfiria de Doss/deficiencia en ALA deshidratasa	Δ -aminolevulinato deshidratasa (ALAD)
Porfiria intermitente aguda (AIP)	Hidroximetilbilano (HMB) sintasa
Porfiria eritropoyética congénita (CEP)	Uroporfirinógeno (URO) sintasa
Porfiria cutánea tardía (PCT)	Uroporfirinógeno (URO) sintasa
Coproporfiria hereditaria (HCP)	Coproporfirinógeno (COPRO) oxidasa
Porfiria variegada (VP)	Protoporfirinógeno (PROTO) oxidasa
Protoporfiria eritropoyética (EPP)	Ferroquelatasa

En otra realización, puede utilizarse un vector retrovítico de la invención para tratar el gen que codifica un enzima deficiente para tratar una forma de mucopolisacaridosis. El vector retrovítico es un vector lentivítico mínimo autoinactivador no replicante derivado del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o del virus de la anemia infecciosa equina (VAIE), que puede pseudotiparse con VEV-G o una proteína de cubierta vírica alternativa. El gen que porta el vector retrovítico es el codificante del enzima defectuoso asociado al tipo de mucopolisacaridosis que debe tratarse, seleccionado de la tabla a continuación. La expresión del gen o genes puede estar controlada por el promotor del CMV o un promotor alternativo.

Tipo de mucopolisacaridosis	Enzima defectuoso
Síndrome de Hurler / síndrome de Hurler-Scheie / síndrome de Scheie	α -L-iduronidasa
Síndrome de Hunter	Iduronato sulfatasa
Síndrome de Sanfilippo A	Heparán sulfamidasa
Síndrome de Sanfilippo B	N-acetilglucosaminidasa
Síndrome de Sanfilippo C	Heparán- α -glucosaminidasa N-acetiltransferasa
Síndrome de Sanfilippo D	3 N-acetilglucosamina 6-sulfatasa
Síndrome de Morquio A	Galactosa-6-sulfato sulfatasa
Síndrome de Morquio B	β -galactosidasa
Síndrome de Maroteaux-Lamy	N-acetilgalactosamina -4-sulfatasa
Síndrome de Sly	β -glucuronidasa
síndrome de Natowicz	Hialuronidasa

25 Producción de vectores terapéuticos retrovíticos.

Pueden producirse vectores retrovíticos de la invención mediante transfección transitoria de células HEK293T con cuatro plásmidos.

- (1) el plásmido de genoma del vector retrovítico recombinante codificante del transgén o transgenes requeridos y un sitio de unión que es capaz de interactuar con una proteína de unión a ARN,
- (2) el plásmido de expresión retrovítico sintético de *gag/pol*,
- (3) el plásmido de expresión de cubierta (env), que puede, por ejemplo, expresar VEV-G,
- (4) el plásmido de expresión de la proteína de unión a ARN.

Alternativamente, pueden producirse vectores retrovíticos de la invención, tales como VIH, mediante transfección transitoria de células HEK293T con cinco plásmidos

- (1) el plásmido de genoma del vector retrovítico recombinante codificante del transgén o transgenes requeridos y un sitio de unión que es capaz de interactuar con una proteína de unión a ARN y la secuencia de ERR,
- (2) el plásmido de expresión retrovítico sintético de *gag/pol*,
- (3) el plásmido de expresión de cubierta (env), que puede, por ejemplo, expresar VEV-G,

- (4) el plásmido de expresión de la proteína de unión a ARN.
- (5) el plásmido de expresión de REV.

5 Alternativamente, un sistema de transfección transitoria puede utilizar una línea celular que expresa establemente la proteína de unión a ARN de la invención (por ejemplo, TRAP).

10 Alternativamente, pueden producirse vectores retrovéricos de la invención mediante la utilización de células de empaquetamiento que expresan establemente (1) gag/pol, (2) env y (3) la proteína de unión a ARN, y, para los vectores VIH, Rev, y en los que un plásmido codificante del genoma de vector retrovérico recombinante que codifica el transgén o transgenes requeridos y un sitio de unión que es capaz de interactuar con la proteína de unión a ARN, y para los vectores VIH, incluye la secuencia de ERR, que se introducen en dichas células mediante transfección transitoria.

15 Alternativamente, pueden producirse vectores retrovéricos de la invención en células productoras que expresan establemente (1) gag/pol, (2) env, (3) la proteína de unión a ARN, (4) el genoma del vector VAIE recombinante que codifica el transgén o transgenes requeridos y un sitio de unión que es capaz de interactuar con la proteína de unión a ARN.

20 Alternativamente, pueden producirse vectores VIH de la invención en células productoras que expresan establemente (1) gag/pol, (2) env, (3) la proteína de unión a ARN, (4) el genoma del vector VIH recombinante que codifica el transgén o transgenes requeridos y un sitio de unión que es capaz de interactuar con la proteína de unión a ARN, y la secuencia de ERR, y (5) REV.

Vectores terapéuticos VAA.

25 En una realización, puede utilizarse un vector VAA de la invención para introducir los tres genes que codifican tres enzimas de la ruta sintética de la dopamina para tratar la enfermedad de Parkinson. Los genes que porta el vector VAA pueden comprender una forma truncada del gen de la tirosina hidroxilasa humana (TH*) (sin los 160 aminoácidos N-terminales implicados en la regulación por retroalimentación de TH), la L-aminoácido aromático descarboxilasa humana (AADC, por sus siglas en inglés) y el gen de la GTP-ciclohidrolasa-1 humana (CH1). Los tres enzimas pueden estar codificados por el vector VAA en tres marcos de lectura abierta separados. Alternativamente, el vector VAA puede codificar una fusión de los enzimas TH y CH1 en un primer marco de lectura abierta y el enzima AADC en un segundo marco de lectura abierta. La expresión de los genes puede estar controlada por un promotor del CMV, y el casete de expresión puede incluir uno o más elementos IRES. El vector VAA puede administrarse mediante inyección directa en el cuerpo estriado del cerebro.

35 En otra realización, puede utilizarse un vector VAA de la invención como producto de terapia génica diseñado para introducir el gen MYO7A corrector en fotorreceptores y células epiteliales pigmentarias retinianas (EPR) de soporte y, de esta manera, atenuar o revertir el deterioro de la visión que se asocia al síndrome de Usher 1B. El gen portador por el vector VAA es ADNc de MYO7A, que codifica para la proteína MYO7A (un gen grande de más de 100 mb de longitud). La expresión del gen grande MYO7A puede estar controlada por un promotor del CMV, un promotor quimérico CMV/MYO7A o un promotor alternativo. El vector VAA puede administrarse mediante inyección subretiniana directa tras vitrectomía del ojo.

45 En otra realización, puede utilizarse un vector VAA de la invención para introducir el gen corrector de casete de unión a ATP, ABCA4 (también conocido como ABCR), en fotorreceptores y, de esta manera, atenuar o revertir la fisiopatología que conduce a la enfermedad de Stargardt. El gen que porta el vector VAA es ADNc de ABCA4, que codifica para la proteína ABCA4. La expresión del gen ABCA4 puede estar controlada por un promotor del CMV, un promotor específico de fotorreceptores, tal como la rodopsina quinasa, o un promotor alternativo. El vector VAA puede administrarse mediante inyección subretiniana directa tras vitrectomía del ojo.

50 En otra realización, puede utilizarse el vector VAA de la invención como producto de terapia génica diseñado para evitar la recurrencia del crecimiento aberrante de los vasos sanguíneos y/o la fuga vascular en los ojos de pacientes con degeneración macular asociada a la edad (DMAE) húmeda, edema macular diabético u oclusión de la vena retiniana, y/o para evitar el crecimiento aberrante de vasos sanguíneos en los ojos de pacientes con degeneración macular asociada a la edad (DMAE) seca. Este vector VAA transporta uno o más genes codificantes de una o más proteínas antiangiogénicas, tales como la angiostatina y/o la endostatina. En una realización, el vector VAA expresa los genes humanos de la endostatina y angiostatina en una configuración bicistrónica utilizando un sitio interno de entrada ribosómica (IRES) para la administración en células epiteliales pigmentarias de la retina. La expresión del gen o genes antiangiogénicos puede estar controlada por un promotor del CMV, un promotor específico del EPR, tal como el promotor 2 de la distrofia macular viteliforme (VMD2, por sus siglas en inglés) (más recientemente conocido como el promotor bestrofina) o por un promotor alternativo. El vector VAA puede administrarse mediante inyección subretiniana directa tras vitrectomía del ojo.

65 En otra realización, puede utilizarse el vector VAA de la invención como producto de terapia génica diseñado para evitar el rechazo del injerto corneal como resultado de la neovascularización mediante la administración de uno o más genes antiangiogénicos en la córnea del donante antes de la injertación. En una realización, el vector VAA expresa

uno o más genes antiangiogénicos, tales como los genes humanos de la endostatina y angiostatina en una configuración bicistrónica utilizando un sitio interno de entrada ribosómica (IRES) para la administración *ex vivo* en injertos corneales. El vector VAA puede aplicarse en tejido de injerto corneal *ex vivo*, y el tejido donante transducido también puede almacenarse antes del trasplante. La expresión del gen o genes antiangiogénicos puede estar controlada por un promotor constitutivo, tal como el promotor del CMV; sin embargo, también resulta posible utilizar promotores alternativos.

En otra realización, puede utilizarse el vector VAA de la invención como producto de terapia génica diseñado para evitar la recurrencia del crecimiento aberrante de los vasos sanguíneos y/o la fuga vascular en los ojos de pacientes con degeneración macular asociada a la edad (DMAE) húmeda, edema macular diabético u oclusión de la vena retiniana, y/o para evitar el crecimiento aberrante de vasos sanguíneos en los ojos de pacientes con degeneración macular asociada a la edad (DMAE) seca. Este vector VAA administra un gen codificante de una forma soluble de tirosina quinasa similar a *fms* (Flt-1 soluble). La expresión del gen de Flt-1 soluble puede estar controlada por un promotor del CMV, tal como el promotor 2 de la distrofia macular viteliforme (VMD2) (más recientemente conocido como promotor bestrofina) o por un promotor alternativo. El vector VAA puede administrarse mediante inyección subretiniana directa tras vitrectomía del ojo.

En otra realización, puede utilizarse el vector VAA de la invención como producto de terapia génica diseñado para evitar la recurrencia del crecimiento aberrante de los vasos sanguíneos y/o la fuga vascular en los ojos de pacientes con degeneración macular asociada a la edad (DMAE) húmeda, edema macular diabético u oclusión de la vena retiniana, y/o para evitar el crecimiento aberrante de vasos sanguíneos en los ojos de pacientes con degeneración macular asociada a la edad (DMAE) seca. Este vector VAA administra un gen o genes codificantes de la proteína factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF). La expresión del gen de PEDF puede estar controlado por un promotor del CMV, un promotor específico del EPR, tal como el promotor 2 de la distrofia macular viteliforme (VMD2) (más recientemente conocido como promotor bestrofina) o por un promotor alternativo. El vector VAA puede administrarse mediante inyección subretiniana directa tras vitrectomía del ojo.

En otra realización, puede utilizarse el vector VAA de la invención como producto de terapia génica diseñado para evitar la recurrencia del crecimiento aberrante de los vasos sanguíneos y/o la fuga vascular en los ojos de pacientes con degeneración macular asociada a la edad (DMAE) húmeda, edema macular diabético u oclusión de la vena retiniana, y/o para evitar el crecimiento aberrante de vasos sanguíneos en los ojos de pacientes con degeneración macular asociada a la edad (DMAE) seca. Este vector VAA administra uno o más genes codificantes de un inhibidor del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF, por sus siglas en inglés), tal como un anticuerpo anti-VEGF o fragmento de unión del mismo, un aptámero específico de VEGF o un péptido o polipéptido bloqueante de VEGF, incluyendo, aunque sin limitación, una forma soluble de un receptor de VEGF y/o un inhibidor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), tal como un anticuerpo anti-PDGF o fragmento de unión del mismo, un aptámero específico de PDGF o un péptido o polipéptido bloqueante de PDGF, incluyendo, aunque sin limitación, una forma soluble de un receptor de PDGF. En una realización, el vector VAA expresa un inhibidor de VEGF y un inhibidor de PDGF en una configuración bicistrónica utilizando un sitio interno de entrada ribosómica (IRES) para la administración en células epiteliales pigmentarias de la retina. La expresión del gen o genes puede estar controlada por un promotor del CMV, un promotor específico del EPR, tal como el promotor 2 de la distrofia macular viteliforme (VMD2) (más recientemente conocido como promotor bestrofina) o por un promotor alternativo. El vector VAA puede administrarse mediante inyección subretiniana directa tras vitrectomía del ojo.

En otra realización, puede utilizarse un vector VAA de la invención para introducir el gen corrector de la distrofia macular viteliforme 2 (VMD2) y un casete codificante de un micro-ARN (ARNmi) específico para la forma asociada a enfermedad de VMD2, o el gen RDS corrector codificante de periferina-2 y un casete codificante de un ARNm específico para la forma asociada a enfermedad de RDS en células epiteliales pigmentarias retinianas, y de esta manera atenuar o revertir la fisiopatología que conduce a la enfermedad de Best o A la degeneración macular viteliforme de Best (BVMD). La expresión de los genes puede estar controlada por un promotor del CMV, un promotor específico del EPR, tal como el promotor 2 de la distrofia macular viteliforme (VMD2) (más recientemente conocido como promotor bestrofina) o por un promotor alternativo. El vector VAA puede administrarse mediante inyección subretiniana directa tras vitrectomía del ojo.

En otra realización, puede utilizarse un vector VAA de la invención para introducir el gen corrector de proteína 1 de unión al retinaldehído, RLBP1, en células epiteliales pigmentarias retinianas y, de esta manera, atenuar o revertir la fisiopatología que conduce a la distrofia retiniana asociada a RLBP1. El gen que porta el vector VAA es ADNc de RLBP1, que codifica para la proteína RLBP1. La expresión del gen de RLBP1 puede estar controlado por un promotor del CMV, un promotor específico del EPR, tal como el promotor 2 de la distrofia macular viteliforme (VMD2) (más recientemente conocido como promotor bestrofina) o por un promotor alternativo. El vector VAA puede administrarse mediante inyección subretiniana directa tras vitrectomía del ojo.

En otra realización, puede utilizarse un vector VAA de la invención como producto de terapia génica diseñado para tratar el glaucoma. Este vector VAA administra uno o más genes codificantes de COX-2 y/o receptor de prostaglandina F2 α (FPR). En una realización, el vector VAA expresa los genes de COX-2 y del receptor de prostaglandina F2 α (FPR) en una configuración bicistrónica utilizando un sitio interno de entrada ribosómica (IRES) para la administración en la

cámara anterior del ojo. La expresión del gen o genes puede estar controlada por el promotor del CMV o un promotor alternativo. El vector VAA puede administrarse mediante inyección transcorneal.

5 En otra realización, puede utilizarse un vector VAA de la invención para introducir el gen corrector de harmonina para atenuar o revertir la fisiopatología que conduce al síndrome de Usher 1c. El gen que porta el vector VAA es ADNc de harmonina, que codifica para la proteína harmonina. La expresión del gen de la harmonina puede estar controlada por el promotor del CMV o un promotor alternativo. El vector VAA puede administrarse mediante inyección subretiniana directa tras vitrectomía del ojo.

10 En otra realización, puede utilizarse un vector VAA de la invención para introducir el gen corrector de la proteína Rab escolta 1 (REP1) para atenuar o revertir la fisiopatología que conduce a la coroidemia. El gen que porta el vector VAA es ADNc de REP1, que codifica para la proteína REP1. La expresión del gen REP1 puede estar controlada por el promotor del CMV o un promotor alternativo. El vector VAA puede administrarse mediante inyección subretiniana directa tras vitrectomía del ojo.

15 En otra realización, puede utilizarse un vector VAA de la invención para introducir el gen o genes correctores de canal beta 2 activado por nucleótidos cíclicos (CNGB2) y/o el gen o genes del canal alfa 3 activado por nucleótidos cíclicos (CNGA3) en el ojo para atenuar o revertir la fisiopatología que conduce a la acromatopsia. El gen o genes portados por el vector VAA son el gen CNGB2 y/o el gen CNGA3, que codifican para las proteínas CNGB2 y/o CNGA3. La expresión del gen o genes puede estar controlada por el promotor del CMV o un promotor alternativo. El vector VAA puede administrarse mediante inyección subretiniana directa tras vitrectomía del ojo.

20 En otra realización, puede utilizarse un vector VAA de la invención para introducir el gen corrector de CEP290 en el ojo para atenuar o revertir la fisiopatología que conduce a la amaurosis congénita de Leber (ACL). El gen que porta el vector VAA es el gen CEP290, que codifica para la proteína centrosómica de 290 kDa. La expresión del gen CEP290 puede estar controlada por el promotor del CMV o un promotor alternativo. El vector VAA puede administrarse mediante inyección subretiniana directa tras vitrectomía del ojo.

25 En otra realización, puede utilizarse un vector VAA de la invención para introducir el gen corrector del regulador de GTPasa (RPGR) de la retinitis pigmentosa en el ojo para atenuar o revertir la fisiopatología que conduce a la retinitis ligada a X. El gen que porta el vector VAA es ADNc de RPGR, que codifica para la proteína RPGR. La expresión del gen RPGR puede estar controlada por el promotor del CMV o un promotor alternativo. El vector VAA puede administrarse mediante inyección subretiniana directa tras vitrectomía del ojo.

30 En otra realización, puede utilizarse un vector VAA de la invención para introducir el gen corrector de la retinosquisina 1 (RS1) en el ojo para atenuar o revertir la fisiopatología que conduce a la retinosquisis ligada a X. El gen que porta el vector VAA es ADNc de RS1, que codifica para la proteína RS1. La expresión del gen RS1 puede estar controlada por el promotor del CMV o un promotor alternativo. El vector VAA puede administrarse mediante inyección subretiniana directa tras vitrectomía del ojo.

35 En otra realización, puede utilizarse un vector VAA de la invención para introducir el gen corrector de retinitis pigmentosa 1 (RP1) en el ojo para atenuar o revertir la fisiopatología que conduce a la retinitis pigmentosa. El gen que porta el vector VAA es ADNc de RP1, que codifica para la proteína RP1. La expresión del gen de RP1 puede estar controlada por un promotor del CMV, un promotor específico de fotorreceptores, tal como la rodopsina quinasa, o un promotor alternativo. El vector VAA puede administrarse mediante inyección subretiniana directa tras vitrectomía del ojo.

40 En otra realización, puede utilizarse un vector VAA de la invención para introducir el gen corrector de la proteína de 65 kDa específica del epitelio pigmentario retiniano (RPE65) para atenuar o revertir la fisiopatología que conduce a la amaurosis congénita de Leber (ACL) de tipo 2. El gen que porta el vector VAA es ADNc de RPE65, que codifica para la proteína RPE65. La expresión del gen de RPE65 puede estar controlado por un promotor específico de EPR, tal como el promotor 2 de la distrofia macular viteliforme (VMD2) (más recientemente conocido como promotor bestrofina) o por un promotor alternativo. El vector VAA puede administrarse mediante inyección subretiniana directa tras vitrectomía del ojo.

45 En otra realización, puede utilizarse un vector VAA de la invención para introducir el gen corrector de la proteína rica en prolina/arginina con repeticiones de leucina terminales (PRELP) para atenuar o revertir la fisiopatología que conduce a degeneración macular asociada a la edad (DMAE) húmeda, DMAE seca, edema macular diabético u oclusión de la vena retiniana. El gen que porta el vector VAA es ADNc de PRELP, que codifica para la proteína PRELP. La expresión del gen de PRELP puede estar controlado por un promotor específico de EPR, tal como el promotor 2 de la distrofia macular viteliforme (VMD2) (más recientemente conocido como promotor bestrofina) o por un promotor alternativo. El vector VAA puede administrarse mediante inyección subretiniana directa tras vitrectomía del ojo.

50 En otra realización, puede utilizarse un vector VAA de la invención para introducir una secuencia de ácidos nucleicos codificante de un ARNmi específico de miocilina sintético en el ojo para atenuar o revertir la fisiopatología que conduce al glaucoma de ángulo abierto juvenil mediante la inactivación de la expresión de la miocilina. La expresión del ARNmi

específico de miocilina sintético puede estar controlada por el promotor del CMV o un promotor alternativo. El vector VAA puede administrarse mediante inyección subretiniana directa tras vitrectomía del ojo.

5 En otra realización, puede utilizarse un vector VAA de la invención para introducir uno o más enzimas limitadores de la velocidad procedentes de la ruta de la biosíntesis del glutatión, la glutamato-cisteína ligasa (GCL) y/o la glutatión sintetasa (GSS), y una secuencia de ácidos nucleicos codificante de un ARNm específico de gamma-glutamyltransferasa (GGT) sintético en el ojo para atenuar o revertir la fisiopatología que conduce a la retinitis pigmentosa mediante potenciación y/o inactivación génica. La expresión del gen GCL y/o GSS y/o ARNm específico de GGT sintético puede estar controlada por un promotor del CMV o por un promotor alternativo. En una realización, 10 el vector VAA puede expresar el gen o genes y/o el ARNm sintético en una configuración multicistronica utilizando uno o más sitios internos de entrada ribosómica (IRES). El vector VAA puede administrarse mediante administración directa en la cámara anterior del ojo.

15 En otra realización, puede utilizarse un vector VAA de la invención como producto de terapia génica diseñado para tratar trastornos neurodegenerativos, tales como la demencia del lóbulo frontotemporal, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington y los trastornos de las neuronas motoras, tales como la esclerosis lateral amiotrófica (ELA). Este vector retrovírico administra un gen codificante de la proteína VEGF, que puede ser una isoforma A de VEGF, tal como VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, o VEGF₁₈₉; o puede ser VEGF-B, VEGF-C o VEGF-D, presentando dichos genes un efecto neuroprotector. La expresión del gen puede estar controlada por el promotor del CMV o un promotor alternativo. El vector retrovírico puede administrarse mediante inyección directa en grandes grupos musculares o mediante inyección directa en el líquido cefalorraquídeo mediante inyección intratecal o 20 intraventricular.

25 En otra realización, puede utilizarse un vector VAA de la invención como producto de terapia génica diseñado para tratar la fibrosis quística. Este vector VAA administra un gen codificante del regulador de la conductancia transmembranal de la fibrosis quística (CFTR). La expresión del gen puede estar controlada por el promotor del CMV o un promotor alternativo. El vector VAA puede administrarse por vía intranasal, mediante la utilización de un nebulizador, o mediante administración directa mediante lavado alveolar bronquial en los pulmones.

30 En otra realización, el vector VAA de la invención puede utilizarse para introducir uno o más genes correctores de N-sulfoglucosamina sulfohidrolasa (SGSH) y/o factor 1 modificador de la sulfatasa (SUMF1) en el cerebro para atenuar o revertir la fisiopatología que conduce al síndrome de Sanfilippo A. El gen o genes portados por el vector VAA son el ADNc de SGSH, que codifica para la proteína SGSH y/o el gen SUMF1 que codifica para la proteína SUMF1. La expresión del gen o genes puede estar controlada por el promotor del CMV o un promotor alternativo. En una 35 realización, el vector VAA puede expresar los genes SGSH y SUMF1 en una configuración multicistronica utilizando un sitio interno de entrada ribosómica (IRES). El vector VAA puede administrarse mediante inyección intracerebral directa.

40 En otra realización, puede utilizarse un vector VAA de la invención para introducir el gen corrector de la alfa-glucosidasa ácida (GAA) en grandes grupos musculares y/o en los pulmones para atenuar o revertir la fisiopatología que conduce a la enfermedad de Pompe. Este vector VAA administra un gen codificante de la proteína GAA. La expresión del gen puede estar controlada por el promotor del CMV o un promotor alternativo. El vector VAA puede administrarse mediante (i) inyección directa en grandes grupos musculares y/o (ii) por vía intranasal, mediante la utilización de un nebulizador, o mediante administración directa mediante lavado alveolar bronquial en los pulmones. 45

En otra realización, puede utilizarse un vector VAA de la invención para introducir un gen corrector, Factor VIII, en células hepáticas, musculares o adiposas, para tratar la hemofilia A. El gen que porta el vector VAA es el Factor VIII. La expresión del gen de Factor VIII puede estar controlada por el promotor del CMV o un promotor alternativo.

50 En otra realización, puede utilizarse un vector VAA de la invención para introducir un gen corrector, Factor IX, en células hepáticas, musculares o adiposas, para tratar la hemofilia B. El gen que porta el vector VAA es el Factor IX. La expresión del gen de Factor IX puede estar controlada por el promotor del CMV o un promotor alternativo.

55 En otra realización, puede utilizarse un vector VAA de la invención para tratar el gen que codifica un enzima deficiente para tratar una forma de porfiria. El gen que porta el vector VAA es el codificante del enzima defectuoso asociado al tipo de porfiria que debe tratarse, seleccionado de la tabla a continuación. La expresión del gen o genes puede estar controlada por el promotor del CMV o un promotor alternativo.

Tipo de porfiria	Enzima defectuoso
Anemia sideroblástica ligada al X (XLSA)	δ-aminolevulinato (ALA) sintasa
Porfiria de Doss/deficiencia en ALA deshidratasa	Δ-aminolevulinato deshidratasa (ALAD)
Porfiria intermitente aguda (AIP)	Hidroximetilbilano (HMB) sintasa
Porfiria eritropoyética congénita (CEP)	Uroporfirinógeno (URO) sintasa
Porfiria cutánea tardía (PCT)	Uroporfirinógeno (URO) sintasa

Coproporfirina hereditaria (HCP)	Coproporfinógeno (COPRO) oxidasa
Porfiria variegada (VP)	Protoporfinógeno (PROTO) oxidasa
Protoporfirina eritropoyética (EPP)	Ferroquelatasa

5 En otra realización, puede utilizarse un vector VAA de la invención para tratar el gen que codifica un enzima deficiente para tratar una forma de mucopolisacaridosis. El gen que porta el vector VAA es el codificante del enzima defectuoso asociado al tipo de mucopolisacaridosis que debe tratarse, seleccionado de la tabla a continuación. La expresión del gen o genes puede estar controlada por el promotor del CMV o un promotor alternativo.

Tipo de mucopolisacaridosis	Enzima defectuoso
Síndrome de Hurler / síndrome de Hurler-Scheie / síndrome de Scheie	α -L-iduronidasa
Síndrome de Hunter	Iduronato sulfatasa
Síndrome de Sanfilippo A	Heparán sulfamidasa
Síndrome de Sanfilippo B	N-acetilglucosaminidasa
Síndrome de Sanfilippo C	Heparán- α -glucosaminidasa N-acetiltransferasa
Síndrome de Sanfilippo D	3 N-acetilglucosamina 6-sulfatasa
Síndrome de Morquio A	Galactosa-6-sulfato sulfatasa
Síndrome de Morquio B	β -galactosidasa
Síndrome de Maroteaux-Lamy	N-acetilgalactosamina -4-sulfatasa
Síndrome de Sly	β -glucuronidasa
síndrome de Natowicz	Hialuronidasa

10 En otra realización, puede utilizarse un vector VAA de la invención como producto de terapia génica diseñado para evitar la recurrencia del crecimiento aberrante de vasos sanguíneos en el edema de los ojos de pacientes con degeneración macular asociada a la edad (DMAE) húmeda. Este vector VAA transporta uno o más genes codificantes de una o más proteínas antiangiogénicas, tales como la angiostatina y/o la endostatina. En una realización, el vector VAA expresa los genes humanos de la endostatina y angiostatina en una configuración bicistrónica utilizando un sitio interno de entrada ribosómica (IRES) para la administración en células epiteliales pigmentarias de la retina. La expresión del gen o genes antiangiogénicos puede estar controlada por un promotor del CMV, un promotor específico del EPR, tal como el promotor 2 de la distrofia macular viteliforme (VMD2, por sus siglas en inglés) (más recientemente conocido como el promotor bestrofina) o por un promotor alternativo. El vector VAA puede administrarse mediante inyección subretiniana directa tras vitrectomía del ojo.

20 En otra realización, puede utilizarse un vector VAA de la invención como producto de terapia génica diseñado para tratar trastornos neurodegenerativos, tales como la demencia del lóbulo frontotemporal, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington y los trastornos de las neuronas motoras, tales como la esclerosis lateral amiotrófica (ELA). Este vector retroviral administra un gen codificante de la proteína VEGF, que puede ser una isoforma A de VEGF, tal como VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, o VEGF₁₈₉; o puede ser VEGF-B, VEGF-C o VEGF-D, presentando dichos genes un efecto neuroprotector. La expresión del gen puede estar controlada por el promotor del CMV o un promotor alternativo. El vector VAA puede administrarse mediante inyección directa en el líquido cefalorraquídeo que baña la médula espinal mediante inyección intraventricular o intratecal.

Método de tratamiento

30 Otro aspecto de la exposición se refiere a un método de tratamiento que comprende administrar el vector vírico de la exposición o a una célula transducida con el vector vírico de la exposición en un sujeto que lo necesita.

35 Debe apreciarse que entre todas las referencias en la presente memoria a tratamiento se incluye el tratamiento curativo, paliativo y profiláctico, aunque en el contexto de la presente exposición, las referencias a la prevención están más comúnmente asociadas al tratamiento profiláctico. El tratamiento puede incluir además la prevención o el retraso de la progresión de la enfermedad. El tratamiento de los mamíferos resulta particularmente preferente. Los tratamientos tanto humanos como veterinarios se encuentran dentro del alcance de la presente exposición.

40 En una realización, los vectores víricos o partículas de vector vírico de la invención pueden ser para la utilización como vacunas. Las vacunas pueden ser, por ejemplo, vacunas basadas en virus humanas o veterinarias (p.ej., vacunas de virus influenza y de virus de la enfermedad de Newcastle).

45 La presente invención puede resultar de particular utilidad en donde la vacuna se basa en un virus competente modificado que aloja un transgén.

Tal como se ha comentado anteriormente, pueden utilizarse células de producción aviarias en la producción de vectores víricos y partículas de vector vírico para la utilización como vacunas.

Composiciones farmacéuticas

Otro aspecto de la exposición se refiere a una composición farmacéutica que comprende el vector vírico de la exposición o una célula o tejido transducido con el vector vírico de la exposición, en combinación con un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

5 La presente exposición proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento de un individuo mediante terapia génica, en la que la composición comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un vector. La composición farmacéutica puede ser para la utilización en el ser humano o en animales.

10 La composición puede comprender un portador, diluyente, excipiente o adyuvante farmacéuticamente aceptable. La elección de portador, excipiente o diluyente farmacéutico puede realizarse con respecto a la vía de administración pretendida y la práctica farmacéutica estándar. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender, o adicionalmente al portador, excipiente o diluyente, cualquier ligante o ligantes, lubricante o lubricantes, agente o agentes de suspensión, agente o agentes de recubrimiento, agente o agentes solubilizadores y otros agentes portadores adecuados que puedan ayudar o incrementar la entrada del vector en el sitio diana (tal como, por ejemplo, un sistema de administración de lípidos).

20 En caso apropiado, la composición puede administrarse mediante una o más cualesquiera de inhalación, en forma de un supositorio o pesario, tópicamente en forma de una loción, solución, crema, pomada o polvos para uso tópico; mediante la utilización de un parche en la piel; oralmente en forma de tabletas que contienen excipientes, tales como almidón o lactosa, o en cápsulas u óvulos, solos o en una mezcla con excipientes, o en forma de elixires, soluciones o suspensiones que contienen agentes saborizantes o colorantes, o pueden inyectarse por vía parenteral, por ejemplo por vía intracavernosa, intravenosa, intramuscular, intracraneal, intraocular o subcutánea. Para la administración parenteral, las composiciones pueden utilizarse óptimamente en forma de una solución acuosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo suficientes sales o monosacáridos para que la solución sea isotónica con la sangre. Para la administración bucal o sublingual, las composiciones pueden administrarse en forma de tabletas o pastillas, que pueden formularse de una manera convencional.

30 El vector de la exposición puede utilizarse además para transducir células diana o tejido diana *ex vivo* antes de la transferencia de dicha célula o tejido diana al paciente que necesita de los mismos. Un ejemplo de dicha célula pueden ser células T autólogas y un ejemplo de dicho tejido puede ser una córnea de un donante.

Método de cribado

35 Otro aspecto de la exposición se refiere a un método para identificar sitios de unión a ácido nucleico y/o proteínas de unión a ácidos nucleicos que son capaces de interactuar de manera que la traducción de un nucleótido de interés resulta reprimida o bloqueada en la célula de producción de vector vírico al ligarse operablemente con el sitio de unión a ácidos nucleicos, en el que el método comprende analizar la expresión de un gen informador en la célula que comprende tanto el sitio de unión a ácido nucleico operablemente ligado al gen informador como la proteína de unión a ácido nucleico.

40 El método puede permitir la identificación de nuevas proteínas de unión a ARN y sus sitios de unión correspondientes que resultan útiles en la presente invención. El método también puede permitir la identificación de variantes de proteínas de unión a ARN o sitios de unión conocidos.

45 En una realización, el método permite la identificación de sitios de unión que interactúan con TRAP.

50 En otra realización, el método permite la identificación de proteínas de unión a ácidos nucleicos, que interactúan con un sitio de unión que es capaz de unión a TRAP.

En una realización, el gen informador codifica una proteína fluorescente.

55 En otra realización, el gen informador codifica un marcador de selección positiva de crecimiento celular, por ejemplo el producto del gen *sh ble* que proporciona resistencia a la célula a Zeocin™.

En otra realización, el gen informador codifica un marcador de selección negativa de crecimiento celular, por ejemplo el producto del gen de timidina quinasa del VHS que causa la muerte celular en presencia de Ganciclovir.

60 Un ejemplo de cribado de sitio de unión a TRAP (tbs) para una funcionalidad mejorada puede ser el siguiente:

- Síntesis a biblioteca de ADN degenerado que comprende 8 repeticiones de la secuencia RAGNN o un total de 8 repeticiones de RAGNN y RAGNNN.
- Clonación de la biblioteca dentro de la 5' UTR de un casete génico informador, tal como GFP (preferentemente a 12 o menos nucleótidos de ORF). El gen informador ligado a la biblioteca puede clonarse opcionalmente en un genoma del vector retroviral y producirse una biblioteca de vectores retrovirales.

65

- Introducción estable del casete génico informador ligado a biblioteca en una línea celular (esto puede conseguirse mediante transfección o administración de vectores retrovéricos) y aislamiento de clones individuales.
- Cribado de clones mediante transfección paralela utilizando ADN de control (p.ej., pBlueScript) o ADN plasmídico expresante de TRAP. Medición de la expresión génica de informador en ambos escenarios e identificación de los clones con niveles de gen informador no reprimido, elevados (control) y con niveles de gen informador reprimido, bajos (TRAP).
- Identificación de las secuencias tbs mediante amplificación por PCR y secuenciación de la secuencia tbs a partir del ADN genómico de las células diana procedente de los clones candidatos.

10 EJEMPLOS

Descripción de protocolos, análisis de los datos e informes.

Cotransfección transitoria de informador (tbs)GFP y plásmidos de expresión de TRAP.

El ensayo de la configuración TRAP-tbs se llevó a cabo mediante cotransfección transitoria de células HEK293T con pCMV-GFP o pCMV-tbsGFP (o variantes de los mismos) junto con plásmidos expresantes de TRAP utilizando Lipofectamina 2000CD. Se utilizó ADN de relleno (pBlueScript) para normalizar la cantidad de ADN a 6,1 µg de ADN total por cada placa de 10 cm (presemebrada con $3,5 \times 10^6$ células 24 horas antes de la transfección. Estos parámetros se escalaron a menos según la superficie del recipiente de cultivo de tejidos al utilizar placas multipocillo. Las transfecciones se llevaron por triplicado. En cada experimento se indica la proporción molar de plásmido de informador GFP a plásmido expresante de TRAP. Se sustituyó el medio 18 horas después de la transfección y se llevó a cabo el análisis de GFP en células vivas 48 horas después de la transfección.

Protocolo típico de producción de vectores retro(lenti)-véricos.

La producción de vector mediante transfección transitoria de células HEK293T utilizando los componentes de 3 vectores se realizó con Lipofectamina 2000CD; la proporción de pADN era de 4 µg de genoma de vector, 2 µg de GagPol, 0,1 µg de plásmido de VEV-G por cada placa de 10 cm (placas presemebradas con $3,5 \times 10^6$ células 24 horas antes de la transfección) - estos parámetros se escalaron de acuerdo con la superficie del recipiente. La cotransfección del plásmido de TRAP o plásmido de relleno (pBluescript) se produjo a las proporciones molares indicadas con genoma de vector, p.ej., en una proporción molar 10 a 1 de plásmido de genoma de vector a plásmido de TRAP, la proporción en masa era de 4 µg de genoma de vector a 0,28 µg de plásmido de TRAP. Se añadió butirato sódico el día 2 después de la transfección a una concentración final de 10 mM durante 6 horas antes de la sustitución con medio fresco; se recolectó sobrenadante que contenía vector 20 a 24 horas después. Para la producción de vectores codificantes de GFP, se llevó a cabo el análisis de GFP en células vivas 48 horas después de la transfección. Se prepararon muestras de células de producción de final de vector para la inmunotransferencia utilizando tampón de fraccionamiento (NaCl 130 mM, Tris-HCl 20 mM [pH 7,4], EDTA 2 mM, IEGPAL al 0,2%) y se separaron los núcleos mediante centrifugación. Los sobrenadantes de recolección de vectores se filtraron a través de filtros de 0,45 µm y se almacenaron a -80°C antes de los ensayos de titulación de vectores. Los vectores codificantes de GFP se titularon mediante transducción de las células diana y análisis 3 días después mediante citometría de flujo (ver posteriormente). Los vectores terapéuticos se titularon mediante PCRq del ADN de la célula huésped 10 días después de la transducción (ensayo de integración de ADN; ver posteriormente) o mediante inmunofluorescencia frente al producto del transgén 3 días después de la transducción.

Evaluación de la proteína GFP global en las poblaciones celulares transfectadas.

El análisis de las células positivas para GFP se llevó a cabo principalmente mediante citometría de flujo, que permitió una cuantificación precisa de tanto el porcentaje de células positivas para GFP en la población como también el grado de expresión de GFP por célula, según mediciones de la mediana de la intensidad de fluorescencia. Debe indicarse que se informa de la magnitud de la expresión de GFP global en la población transfectada mediante multiplicación del porcentaje del número de células positivas para GFP por la mediana de la intensidad de fluorescencia (MIF, unidades arbitrarias), rindiendo una Puntuación de expresión. Los presentes inventores consideran que esta medida es una mejor representación del nivel total de expresión de proteína GFP en la población de células transfectadas. En esencia, supone que la distribución del nivel de expresión de GFP dentro de la población transfectada es una distribución normal y, por lo tanto, aproxima la "superficie bajo la curva". Lo anterior se llevó a cabo porque informar de la expresión de GFP basándose únicamente en el porcentaje de positivos o en la MIF proporciona una 'descripción' limitada de la población que se analiza (ver la figura 5 para una explicación). Por lo tanto, el 'factor de represión' es una medida del impacto de TRAP sobre la traducción de GFP y se calculó dividiendo la Puntuación de expresión de controles 'de relleno' por la Puntuación de expresión de la muestra de ensayo de plásmido de expresión de TRAP relevante.

SDS-PAGE e inmunotransferencia

Se llevaron a cabo protocolos estándares de SDS-PAGE e inmunotransferencia en principalmente células de producción de final de vector, tras la recolección de vectores. Para el análisis de inmunotransferencia de las partículas de vector, se centrifugaron a 21.000 rpm en una microcentrífuga ~2 ml de sobrenadante de vectores filtrado, durante

1-2 horas a 4°C antes de resuspender el 'pellet' en 20 a 30 µl de PBS. Estas preparaciones de vector concentrado se cuantificaron mediante ensayo PERT (posteriormente) y se cargaron 7×10^4 UT de vector predichas mediante PERT por cada pocillo de un gel de SDS-PAGE. Se lisaron aproximadamente 1×10^6 células de producción de final de vector en 200 µl de tampón de fraccionamiento y se separaron los núcleos mediante centrifugación. Las muestras de proteínas se cuantificaron mediante ensayo de BioRad y típicamente se cargaron 5 µg de proteína, en geles preformados de acrilamida al 4-20% de 12-15 pocillos. Las proteínas se transfirieron a nitrocelulosa a 45V durante 3 horas sobre hielo. Las membranas se bloquearon en leche al 5%-PBS/Tween-20 durante la noche a 4°C. Las membranas se sondearon con anticuerpos primarios y anticuerpos secundarios-HRP a una dilución típicamente de 1:100 en tampón de bloqueo. Las inmunotransferencias se analizaron mediante detección de ECL seguido de exposición a película de rayos X.

Titulación de vectores retrovíricos

◦ Ensayo de integración

Los sobrenadantes de vector filtrados y recolectados se diluyeron 1:5 en medio antes de utilizar volúmenes de 0,5 ml para transducir 1×10^5 células HEK293T a escala de 12 pocillos en presencia de 8 µg/ml de polibreno. Los cultivos se subcultivaron durante 10 días (divisiones 1:5 cada 2-3 días) antes de extraer el ADN del huésped de 1×10^6 pellets celulares. Se llevó a cabo una PCR cuantitativa utilizando un cebador/sonda FAM configurada en la señal de empaquetamiento de VAIE (ψ) y se calcularon los títulos de vector (UT/ml) utilizando los factores siguientes: volumen de transducción, dilución de vector, ψ copias detectadas por célula y ψ copias detectadas por célula de un control de línea celular de ' ψ de copia única' caracterizado.

◦ Ensayo de informador GFP

Los sobrenadantes de vector codificante de GFP filtrados y recolectados se diluyeron en el intervalo de 1:10 a 1:160 en medio antes de utilizar volúmenes de 0,5 ml para transducir 5×10^4 células HEK293T o $3,74 \times 10^4$ células D17 a escala de 24 pocillos en presencia de 8 µg/ml de polibreno. Los cultivos se analizaron mediante citometría de flujo 3 días después de la transducción utilizando un FACS Verse o FACS Calibur con la configuración sugerida por el fabricante; se capturaron 10.000 sucesos y las células muertas se seleccionaron y eliminaron utilizando un control de mezcla MUERTAS/VIVAS basado en gráficos 2D de SSC/FSC y/o tinción con ToPro3.

◦ Ensayo de inmunofluorescencia (IF) (titulación biológica)

Los sobrenadantes de vector codificante de OXB-102 filtrados y recolectados se diluyeron 1:2 a 1:8 en medio antes de utilizar volúmenes de 0,5 ml para transducir 1×10^5 células HEK293T a escala de 12 pocillos en presencia de 8 µg/ml de polibreno. Se incubaron los cultivos durante 3 días antes de IF en células fijadas y permeabilizadas. Se utilizó un anticuerpo primario de tirosina hidroxilasa (TH) y un anticuerpo secundario-Alexa-488 a diluciones 1:500 en tampón de permeabilización.

◦ Ensayo de informador LacZ

Para los experimentos de mezcla de vector-LacZ, los sobrenadantes de vector filtrados y recolectados se diluyeron en serie 10 veces hasta un factor de 10^{-5} antes de utilizar volúmenes de 0,5 ml de vectores diluidos 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} para transducir células D17 en placas de 12 pocillos que habían sido presembradas con $7,5 \times 10^4$ células 24 horas antes de la transducción. Los cultivos se analizaron 3 días después de la transducción mediante fijación y adición de X-Gal, seguido del recuento de colonias azules para generar los títulos (LFU, UT/ml).

◦ Ensayo PERT

El ensayo PERT ya ha sido descrito (Arnold B.A. Et al., Biotechniques 25:98-106, 1998). El título predicho por PERT (PERT-UT/ml) es un título de partículas físicas arbitrario basado en la actividad de RT asociado al título biológico de una prep. De vector VAIE codificante de GFP utilizado como la curva estándar de qRT-PCR en el ensayo PERT.

Evaluación del impacto sobre la producción de vector retro/lentivírico mediante la expresión de un producto de transgén en células de producción mediante experimentos de mezcla de genomas de vector

Con el fin de evaluar el grado del impacto negativo de un producto de transgén NDI sobre la producción de vectores retrovíricos de una célula, puede llevarse a cabo un experimento simple de mezcla de genomas de vector tal como se indica de manera general en la figura 2. El 'protocolo de producción de vectores retro(lenti)-víricos' indicado anteriormente puede llevarse a cabo utilizando una mezcla de plásmido de genoma de vector de gen informador (p.ej., transgén lacZ o GFP) y un plásmido de genoma de vector que expresa un NDI junto con los componentes de empaquetamiento del vector indicados en la figura 1. La expresión de las proteínas informadoras lacZ o GFP en una célula de producción de vector, tal como HEK293T, está generalmente aceptado que no impacta adversamente en el título o actividad específica de las partículas de vector producidas; por lo tanto, pueden prepararse vectores codificantes de dichos informadores a títulos elevados. De esta manera, la mezcla de plásmidos codificantes de un

genoma de vector con dicho gen informador y los de un genoma de vector codificante de un transgén que *Sí* impacta sobre los títulos de vector, permite cierta medida del impacto mediante la titulación del vector utilizando la actividad del gen informador como lectura en células diana. Lo anterior se debe a que se producirá un efecto 'espectador' sobre el título de vectores de gen informador a partir del impacto de la proteína del transgén 'problemático', ya que todas las partículas de vector se preparan en la misma célula, utilizando la misma maquinaria/rutas celulares para el ensamblaje del virión. La proporción de plásmidos de genoma informador-a-vector NDI utilizada en las transfecciones típicamente es de entre 1:1 y 1:5. Observar que, debido a que las partículas de vector retroviral empaquetan dos copias de ARN genómico en cada virión, se producirá un efecto de 'dilución' sobre el título de vector específico de informador aunque se expresen dos proteínas no problemáticas (p.ej., LacZ y GFP) a partir de dos plásmidos diferentes de genoma de vector dentro de la célula de producción. Por ejemplo, al utilizar una proporción 1:1 de plásmidos de genoma de vector lacZ y GFP, las leyes de la probabilidad dictan que 25% de los viriones contendrán dos copias de ARN del vector lacZ, 25% contendrán dos copias de ARN del vector GFP y el 50% restante de viriones contendrá un ARN de cada vector. En el último escenario, sólo una de las dos moléculas de ARN genómico se transcribirá inversamente en ADN, por lo que hay una probabilidad 50:50 de que uno cualquiera de los genomas de vector informador se integre en las células diana, resultando en la expresión de dicho informador. Conjuntamente, lo anterior significa que, al mezclar dos plásmidos de genomas de vector en la proporción 1:1, el título de vector informador específico se reducirá en 2 veces en comparación con preparaciones de producción de genoma de un solo vector. Al utilizar una proporción de mezcla mayor (p.ej., 1:5), el efecto de dilución será mayor. Por este motivo, se utiliza la mezcla de dos plásmidos de genoma de vector informador como control 'de mezcla' del efecto de dilución, junto con cualquier mezcla del plásmido de genoma de vector informador con el plásmido de genoma de vector que expresa el transgén NDI que se está evaluando.

A título de ejemplo, las figuras 3i y 3ii muestran los datos de diversos experimentos de mezcla de plásmidos de genoma de vector utilizando un plásmido de genoma de vector informador lacZ, con una lectura de título de vector basado en la tinción con X-gal en células diana. La mayoría de los plásmidos de genoma de vector sometidos a ensayo, incluyendo los de RetinoStat®, StarGen™, UshStat® y ReQuinate®, así como vectores que expresan COX-2 y/o FPR impactan sobre los títulos de vector 7 a 100 veces, dependiendo de la proporción de plásmido de vector lacZ a plásmido de vector de ensayo utilizado. Estos datos muestran claramente que la expresión de la proteína del transgén en células de producción de vector contribuye significativamente a los bajos títulos de vector observados con vectores clínicamente relevantes en comparación con vectores de gen informador.

Descripción de la invención en relación a la producción de vectores retrovirales; Sistema de represión de la traducción en células de producción de vector [TRIP]

La figura 4 muestra un esquema simplificado del sistema de represión de la traducción en células de producción de vector [TRIP] aplicado a la producción de vectores retro/lentivirales. Los sistemas TRIP que incluyen componentes necesarios para reprimir la traducción del transgén en otros sistemas de vector vírico (p.ej., vectores basados en adenovirus o VAA) pueden describirse como incluyendo componentes de empaquetamiento específicamente víricos. La totalidad de dichos sistemas TRIP deben contener los dos componentes siguientes además de los componentes de vector necesarios: un casete de expresión de TRAP y el sitio de unión a TRAP (tbs) insertado dentro de la 5'UTR del transgén NDI, de manera que la producción del PDI resulta reprimida en presencia de TRAP. Los ORF de múltiples NDI en una molécula de genoma de vector puede estar regulados por TRAP, es decir, el genoma del vector puede ser multicistónico (p.ej., que contiene elementos IRES) y más de un ORF puede presentar un sitio de unión a TRAP cadena arriba de su codón de inicio de traducción (p.ej., entre el IRES y el ORF cadena abajo).

Descripción de experimentos clave

Ensayos iniciales de la configuración TRAP/tbs mediante la utilización de plásmidos GFP y plásmidos de genoma de vector lentiviral que expresa GFP

Ejemplo 1. Ensayo de la regulación de la expresión de GFP en la cotransfección transitoria con plásmidos de expresión de TRAP.

Se construyó el constructo de informador GFP pCMV-tbsGFP tal como se indica en la figura 6. Se insertó una secuencia de unión de TRAP (tbs) en el constructo de manera que la 5'UTR codificaba (de 5' a 3') un líder de 41 nt, la tbs de 55 nt y una región de 9 nt codificante de la secuencia de consenso de kozak inmediatamente cadena arriba del codón ATG de GFP. Estos constructos de informador GFP se derivaron del genoma de vector VAIE experimental pONY8.4RC-GFP mediante delección del a región entre los dos promotores del CMV (ver la figura 6).

En más detalle, con respecto a la información sobre los informadores de expresión génica fluorescentes, se seleccionó el gen informador de GFP para los experimentos de evaluación iniciales de manera que pudiese llevarse a cabo una evaluación relativamente rápida de la regulación génica mediante citometría de flujo. No se conoce que GFP sea tóxico o perjudicial para la producción de vector, pero se utilizó como un modelo sensible de regulación de la expresión génica por TRAP/tbs. Además, el genoma de vector existente pONY8.4RC-GFP se encontraba disponible para la manipulación; este vector utiliza un VAIE U3 de tipo salvaje en la 3'LTR y un ORF DsRED-express cadena arriba del

casete de transgén interno, tal como se ilustra en la figura 6. Por lo tanto, este plásmido de genoma de vector es capaz de la expresión de GFP y de DsRed-express dentro de las células de producción de vector.

5 La totalidad de dichos constructos informadores contenía la LTR de VAIE de tipo salvaje que permitía la poliadenilación del ARNm obtenido de la transcripción a partir del promotor fuerte del CMV. De esta manera, la expresión de GFP a partir de tanto pCMV-tbsGFP como el plásmido de control pCMV-GFP en células HEK293T era robusta (ver las figuras 8 y 9).

10 Se crearon los constructos de expresión de TRAP utilizando un ORF de TRAP de codones/secuencias optimizados de *Bacillus subtilis* para la expresión elevada en células humanas. En más detalle, la figura 7 muestra el tipo de plásmidos de expresión de TRAP evaluados inicialmente en experimentos de transfección transitoria. Debido a que la proteína TRAP es de origen bacteriano, la secuencia de nucleótidos disponible públicamente es de la secuencia bacteriana codificada dentro del operón de la 'familia génica de proteína de atenuación de la transcripción' *mtrB/TrpBP*. Sin embargo, con el fin de incrementar potencialmente la expresión en células de mamífero, y de eliminar cualesquiera 15 secuencias subóptimas, tales como los sitios donadores/aceptores de corte y empalme, la secuencia de nucleótidos de TRAP se optimizó para los codones/secuencias para la expresión en *Homo sapiens*. Se diseñó la secuencia sintética para la clonación en pCI-NEO, rindiendo pCI-coTRAP. Se situaron sitios de SapI de manera que la digestión y la recircularización permitiesen la fusión de una etiqueta HIS₆ con el extremo C-terminal de la proteína TRAP. Ello rindió finalmente pCI-coTRAP[H6]. Los informes anteriores utilizando plásmidos de expresión de TRAP de codones 20 no optimizados también han utilizado TRAP etiquetado con HIS₆ C-terminalmente sin deterioro de la función de TRAP. Debido a que actualmente no se disponible comercialmente de anticuerpo de TRAP, se utilizó TRAP etiquetado con HIS₆ para determinar el nivel de expresión de TRAP durante los experimentos.

25 El primer conjunto de experimentos utilizó TRAP no etiquetado y TRAP etiquetado con HIS₆ C-terminalmente. Los experimentos de cotransfección con plásmidos TRAP+/etiqueta His₆ y los constructos de tbs-informador GFP demostraron que ambas versiones de TRAP eran capaces de reprimir la expresión de GFP a partir de pCMV-tbsGFP en células HEK293T (figuras 8 y 9). TRAP y TRAP[H6] reprimieron la expresión de GFP en 3 veces y 27 veces, respectivamente, al cotransfectar el plásmido TRAP e informador en una proporción 1:1 (figura 9B). Se observó cierta 30 represión mínima incluso al cotransfectar plásmidos de TRAP a un décimo de dicha dosis, es decir, una proporción molecular de 10:1 (informador:TRAP). Ninguna de las versiones de TRAP impactó sobre la expresión de GFP de pCMV-GFP, demostrando que tbs era esencial para la represión mediada por TRAP.

Ejemplo 2. Optimización de la expresión del plásmido de expresión de TRAP.

35 La expresión de los plásmidos basados en pCI-Neo puede estar sometida a competición directa con otros casetes de ADN controlados por CMV. Por este motivo, se planteó la hipótesis de que pCI-coTRAP[H6] cotransfectado con pCMV-tbsGFP a la dosis de 1/10, podría haber experimentado este tipo de competición, ya que también se utilizó pCI-Neo como ADN de relleno para normalizar la carga de ADN (después de este experimento, se utilizó pBlueScript como el ADN de relleno estándar para todos los demás experimentos). Por lo tanto, se generó el constructo pEF1a-coTRAP[H6] controlado por EF1a tal como se ha indicado anteriormente y se sometió a ensayo en cotransfecciones 40 con pCMV-tbsGFP en diferentes proporciones. La figura 9D resume la represión de GFP en células cotransfectadas con pCI-coTRAP[H6] o pEF1a-coTRAP[H6] junto con los constructos de informador GFP. Estos datos demuestran que pEF1a-coTRAP[H6] puede cotransfectarse con ADN de tbs-informador GFP a la dosis 1/10 y mantener el nivel de represión de GFP observado en la proporción 1:1 (en este caso, se compararon los datos de MIF), en contraste con pCI-coTRAP[H6]. Por lo tanto, el promotor EF1-a puede resultar más preferente para controlar la expresión de TRAP. 45

Debido al método de clonación de pCI-coTRAP y pCI-coTRAP[H6], las 3'UTR de estos constructos no eran idénticas (figura 7), por lo que el motivo potencial para la diferencia observada de funcionalidad de los dos constructos (figura 9) podrían ser los niveles de ARNm/proteína TRAP, y no por alguna diferencia de aminoácido. Para evaluar si la 50 etiqueta HIS₆ C-terminal en TRAP era importante para la funcionalidad, se construyó pEF1a-coTRAP mediante la eliminación de la secuencia de pEF1a-coTRAP[H6] (figura 7); estos constructos eran idénticos excepto por la secuencia de etiqueta HIS₆. Se compararon directamente pEF1a-coTRAP[H6] y pEF1a-coTRAP mediante cotransfección de células HEK293T con plásmidos de tbs-informador GFP en diferentes proporciones (figura 10).

55 Estos demuestran que las proteínas TRAP tanto etiquetadas con HIS₆ como no etiquetadas son capaces de reprimir la expresión de GFP hasta niveles prácticamente indetectables al proporcionarse en una proporción molar 1:1 o 1:0,1 con el plásmido de informador GFP que contenía tbs. La versión de TRAP no etiquetada era 2 veces menos eficaz en la represión que TRAP[H6] en todas las medidas de expresión. Por lo tanto, la etiqueta HIS₆ podría proporcionar cierta ventaja mínima sobre TRAP no etiquetado; ello podría deberse a una estabilidad y/o solubilidad/plegamiento y/o 60 funcionalidad mejorados (p.ej., unión a ARN) de la proteína.

Ejemplo 3. Evaluación de diferentes homólogos de TRAP.

65 Además de TRAP de *Bacillus subtilis*, se ha demostrado que dos otros homólogos de TRAP median en la expresión de GFP a partir de células cotransfectadas con pCMV-tbsGFP y plásmido de expresión de TRAP (figura 11A). Los genes de TRAP de *Desulfotomaculum hydrothermale* y *Aminomonas paucivorans* se optimizaron para sus

codones/secuencias y se clonaron en el plásmido de expresión basado en pEF1; ambas variantes incluían etiquetas His₆ C-terminales. Estas variantes de TRAP compartían 75% y 55% de homología de los aminoácidos con la de TRAP de *Bacillus subtilis*, respectivamente. Las tres variantes eran capaces de represión de la expresión de GFP en células HEK293T del orden de 2 Log, demostrando que los homólogos de TRAP con sólo 55% de homología de secuencia eran capaces de funcionar en el sistema TRIP. Los tres homólogos presentaban conservación de las secuencias participantes en los sitios de unión a ARN y a triptófano (datos no mostrados).

Ejemplo 3b. Evaluación de diferentes homólogos y variantes de TRAP

Con el fin de someter a ensayo si homólogos de TRAP de cepas bacterianas además de la de *Bacillus subtilis* podían funcionar en el sistema de represión, se identificaron cinco variantes de TRAP de diferentes identidades de secuencia respecto a TRAP de *Bacillus subtilis*, en la base de datos del NCBI (figura 21i). Las variantes representaban un amplio abanico de diferentes variantes de TRAP de todo el linaje bacteriano. Las secuencias génicas de estas variantes de TRAP se optimizaron para sus codones para la expresión elevada en células humanas e incluían His₆ C-terminal (de manera similar a TRAP[H6] de *Bacillus subtilis*, que se había mostrado anteriormente que potenciaba la represión mediada por TRAP, figura 10) y se clonaron en el plásmido de promotor pEF1a (figura 7). La variante de TRAP de *B. halodurans* forma un 12-mero natural (Bayfield, O.W. et al. PLoS ONE 7: e44309, 2012. doi:10.1371/journal.pone.0044309), indicando que, potencialmente, 12 repeticiones de RAGNN en un tbs pueden unirse a TRAP. También se ha demostrado que las versiones 12-meras artificiales de las variantes de TRAP 11-meras naturales pueden manipularse mediante modificaciones en el extremo C-terminal de la proteína. Una modificación S72N de TRAP de *Bacillus stearothermophilus* se ha demostrado que resulta en proteínas 12-meras según cristalografía de rayos X (Bayfield O.W. Et al., PLoS ONE 7: e44309, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0044309), aunque no se conoce si se forman los 11-meros o 12-meros de estas variantes en el medio celular. También se construyó la variante S72N de TRAP de *Bacillus stearothermophilus* y se sometió a ensayo junto con otros homólogos de TRAP para la función potencial en el sistema de represión de TRAP. Se utilizaron dos plásmidos de informador GFP que contenían tbs con 11x repeticiones de RAGNN o 12 x RAGNN; se planteó la hipótesis de que los TRAP 12-meros podrían reprimir la expresión de transgén a partir de informador pCM-tbsx12GFP en mayor medida que los 11-meros en el informador pCM-tbs11GFP.

Los datos de la comparación de los diferentes homólogos de TRAP y la variante S72N de TRAP de *B. stearothermophilus* se muestran en la figura 21iiA-B. Todos los homólogos y la variante S72N de TRAP de *B. stearothermophilus* fueron capaces de una represión de por lo menos 10 veces de GFP. Dada la homología de las secuencias de aminoácidos relativamente baja en estos homólogos de TRAP (56-78% en comparación con TRAP de *B. subtilis*, ver la figura 21iii), lo anterior sugiere que las proteínas TRAP de diversas especies bacterianas forman una estructura cuaternaria similar requerida para la interacción con secuencias de ARN de tbs en células de mamífero. Todos los homólogos contenían los residuos aminoácidos que es conocido que son importantes para el contacto con ARN y la unión de L-triptófano; sin embargo, se espera que los mutantes de unión a L-triptófano, que se unen constitutivamente a ARN de tbs (incluso en ausencia de L-triptófano), tal como TRAP T30V de *B. subtilis* (Yakhnin et al., J. Biol. Chem. 275: 4519-4524, 2000), también funcionarán en la configuración de represión mediada por TRAP.

Ejemplo 4. Evaluación de la represión de transgén en líneas celulares HEK293T-TRAP estables.

Con el fin de evaluar la represión mediada por TRAP de la expresión del transgén en el contexto de una línea celular expresante de TRAP estable, se generó el constructo pEF1a-coTRAP[H6]-iBsr y se utilizó para transfectar establemente células HEK293T mediante selección con blasticidina (figura 11B). De entre 100 clones estables, se aislaron cuatro líneas celulares HEK293T-TRAP[H6] subclonadas, 2F, 10H, 7E y 3D, y se sometieron a ensayo para su capacidad de reprimir la expresión de GFP a partir de pCMV-tbsGFP transfectado. Los cultivos se cotransfectaron con plásmido de relleno o plásmido pEF1a-coTRAP[H6] a fin de evaluar si los niveles endógenos de TRAP[H6] eran capaces de conseguir el mismo nivel de represión de GFP que el observado con el plásmido de expresión de TRAP transfectado transitoriamente. Estos datos demuestran que las líneas celulares expresantes de TRAP estables son capaces de un nivel similar de represión del transgén (del orden de 2 Log) a partir de TRAP endógeno en comparación con células HEK293T transfectadas transitoriamente con plásmido de expresión de TRAP. Sin embargo, se observaron niveles incluso mayores de represión de transgén en los clones HEK293T-TRAP[H6] al transfectar transitoriamente plásmido adicional expresante de TRAP (del orden de 4 Log). El motivo para este efecto probablemente es el pool preexistente de TRAP en las células del clon HEK293T-TRAP[H6]. Como explicación adicional, en el escenario de transfección transitoria, existiría un punto temporal temprano después de la cotransfección de pCMV-tbsGFP y pEF1a-coTRAP[H6] en el que se ha acumulado insuficiente proteína TRAP[H6], resultando en una cantidad pequeña pero medible de expresión de GFP antes de que pueda producirse la represión mediada por TRAP del ARNm derivado de pCMV-tbsGFP. Esta pequeña cantidad de expresión de GFP no se observa en células HEK293T-TRAP[H6] debido a que el pool preexistente de TRAP[H6] puede actuar inmediatamente sobre ARNm de tbsGFP *de novo*. Este efecto, junto con el plásmido adicional expresante de TRAP, permite un "factor de represión" mucho mayor de la expresión de GFP en las líneas celulares de TRAP estables. Lo anterior sugiere que la cantidad máxima de expresión de TRAP[H6] en líneas celulares estable no es tan elevada como la observada en la transfección transitoria de células HEK293T (esto se ha confirmado mediante inmunotransferencia con TRAP[H6], datos no mostrados). Sin embargo, es probable que la capacidad de las líneas celulares de TRAP[H6] estables de reprimir la expresión del transgén en más de 2 Log resulte suficiente para mejorar los títulos de vector.

Ejemplo 4b. Desarrollo de líneas celulares HEK293T de expresión estable de TRAP[H6] y utilización de las mismas en la producción de vectores.

5 El presente ejemplo se basa en lo presentado en el Ejemplo 4 y proporciona más información sobre cómo se han desarrollado líneas celulares de TRAP[H6] estables. Se transfectaron establemente células HEK293T con el casete de expresión EF1a-coTRAP[H6]-iBsr (figura 22i) y los clones se aislaron mediante selección con blasticidina. Estos clones de expresión estable de TRAP[H6] (*B. subtilis*) se subclonaron dos veces y después se cribaron para la funcionalidad de represión mediante la transfección con pCMV-GFP (sin represión) o pCMV-tbsgfp. La expresión total de GFP en las poblaciones celulares se estimó mediante generación de la Puntuación de expresión (figura 22iiA; MIF x % de GFP). Se identificaron cuatro clones (2F, 10H, 7E y 3D) que presentaban hasta 2-Log de actividad de represión, así como puntuaciones de expresión de GFP absolutas bajas bajo condiciones de represión (es decir, en presencia de TRAP). Los niveles de represión del transgén de GFP en clones estables se correlacionaban razonablemente bien con el nivel de TRAP[H6] detectado dentro de las células (figura 22iiB). Estos datos indican que la expresión de TRAP no resulta tóxica para las células HEK293T y que las células 'HEK293T.TRIP' (que expresan establemente TRAP; también conocidas como 'HEK293T.TRAP') son capaces de reprimir la expresión del transgén de una manera similar a la observada anteriormente en transfecciones transitorias de plásmidos de TRAP.

20 Los presentes inventores muestran en otro ejemplo que el sistema TRIP puede mejorar los títulos de vector de ReQuinate, un vector VAIE que expresa Factor VIII_h, respecto al sistema estándar de producción de vectores (figura 17). El Factor VIII_h bloquea la incorporación de VEV-G en los viriones de vector VAIE. Se cree que un sistema TRIP estable (es decir, un casete de TRAP integrado) podría ofrecer mejoras de tiempos en la represión del transgén en comparación con el sistema TRIP transitorio (es decir, la cotransfección de plásmido 'pTRAP' con componentes de vector). Lo anterior se debe a que los pools preexistentes de proteína TRAP en células estables se encontrarán inmediatamente disponibles para reprimir el transgén, mientras que en el sistema transitorio 'pTRAP' requiere la expresión hasta que se alcanzar niveles suficientes de la proteína TRAP para reprimir el ARNm del transgén; por lo tanto, en este tiempo temprano, puede producirse algo de expresión 'con pérdidas' del transgén y posiblemente presentar un impacto negativo sobre la producción de vector activo. Para someter a ensayo esta idea, se llevó a cabo un experimento de mezcla de vectores en el que se mezclaron los genomas VAIE-[tbs]GFP y VAIE-[tbs]FVIII (también conocido como ReQuinate-tbs) 50:50 durante la transfección de las células con componentes de vector +/- pEF1a-coTRAP[H6]. Por lo tanto, cualquier impacto negativo de la expresión de FVIII_h sobre la actividad general del virión vector VAIE sería medible en títulos de vector VAIE-GFP. Se sometieron a ensayo las células HEK293T y las líneas celulares HEK293T.TRIP estables 2F, 10H, 7E y 3D. Se analizaron células de final de producción para la expresión de GFP mediante citometría de flujo (figura 22iiiA) y se tituló el vector en bruto producido en células HEK293T frescas y también se analizó mediante citometría de flujo (figura 22iiiB).

40 Los datos en la figura 22iiiA demuestran que las células estables expresantes de TRAP son capaces de una mayor represión del transgén que el sistema TRIP transitorio; la expresión de GFP se redujo en 1000 veces en HEK293T.TRIP-10H (figura 22iiiA, comparando los genomas VAIE-GFP y VAIE-tbsGFP). El grado de represión de GFP (y de extensión, FVIII_h) en las células de producción se correlacionó con el título de los vectores producidos (ver la figura 22iiiB). Globalmente, las líneas celulares HEK293T.TRIP estables produjeron un título ~3 veces mayor que el sistema TRIP transitorio. Aunque la expresión adicional de TRAP en las líneas celulares HEK293T.TRIP estables (+ TRAP TXN) permitió una represión adicional de la expresión del transgén, ello no se tradujo en una mejora adicional del título de este vector codificante de transgén específico. Por lo tanto, es probable que el pool preexistente de TRAP, no la proteína TRAP máxima per se, sea responsable de la mejora de los títulos de vector respecto al sistema transitorio en el presente ejemplo (es decir, los vectores que expresan FVIII_h). Resulta posible que la represión de transgenes más problemáticos/tóxicos se beneficiará tanto de niveles preexistentes como de niveles elevados de TRAP durante la producción de vector.

50 Los sobrenadantes que contienen partículas de vector recolectados de las células productoras de VAIE-[tbs]GFP | VAIE-[tbs]FVIII_h se analizaron para el contenido de VEV-G mediante inmunotransferencia (figura 22iv). Estos datos revelan que sólo al utilizar tbs en el genoma del vector y suministrar TRAP durante la producción de vector (HEK293T + pEF1a-coTRAP[H6] en trans o mediante expresión estable de TRAP) puede incorporarse VEV-G en las partículas de vector.

55 *Ejemplo 5. Ensayo del sistema TRIP en la producción de vectores lentivíricos codificantes de GFP.*

60 El objetivo del experimento era evaluar el potencial impacto de la presencia de tbs dentro del genoma de un vector. En más detalle, debido a que TRAP es capaz de unirse a tbs dentro de la molécula de ARN genómico del vector (así como en el ARNm del transgén) y, por lo tanto, de empaquetarse en viriones de vector *de novo*, se esperaba razonablemente que el procedimiento de transcripción inversa resultase adversamente afectado. La interacción TRAP-tbs resulta de afinidad particularmente elevada (rango nM) y no se conoce si la transcriptasa inversa es capaz de romper esta interacción durante la etapa de transcripción inversa (RT). Con el fin de aplicar la configuración TRAP/tbs a la represión de un transgén de vector en células de producción, se construyó el genoma de vector VAIE pONY8.4RC-tbsGFP a partir de pCMV-tbsGFP (ver la figura 6). Se produjo el vector en células HEK293T utilizando los componentes de empaquetamiento de los genomas pONY8.4RC-tbsGFP o pONY8.4RC-GFP (GagPol y VEV-G) y se

cotransfectaron con o sin pCI-coTRAP[H6] (este experimento se llevó a cabo antes de la construcción de pEF1a-coTRAP[H6]). Las células de final de producción se analizaron mediante citometría de flujo para la expresión de GFP (figura 12A y B) y se utilizaron los sobrenadantes de vector para transducir las células D17 (figura 12C).

La configuración TRAP/tbs era capaz de reprimir GFP a partir del casete de transgén interno del genoma de vector que contenía tbs en un nivel similar al de pCMV-tbsGFP, en contraste con el genoma de vector sin tbs (figura 12A). La expresión de DsRed-X no resultó afectada por TRAP, indicando que se había generado ARN genómico de vector de longitud completa y que era traducible (datos no mostrados). El factor de represión de GFP a partir del plásmido de genoma de vector por TRAP era de 50 a 100 veces (figura 12B). Aunque el factor de represión era más bajo que el observado para pCMV-tbsGFP, ello probablemente se debe a los niveles sin represión más bajos de GFP observados con el genoma de vector, lo que probablemente es el resultado de la competición con el ARN genómico de vector controlado por CMVp externo. Estos datos indican además que la adición de butirato sódico durante la producción de vector, un activador conocido del promotor del CMV, aparentemente no presentó ningún impacto sobre el sistema TRIP (también se añadió butirato sódico a las transfecciones de pCMV-tbsGFP en este experimento).

La figura 12C demuestra que los vectores de GFP que contienen tbs podían producirse a títulos muy similares a los vectores de GFP estándares; pONY8.4RC-tbsGFP producido en presencia de proteína TRAP proporcionó $1,4 \times 10^6$ UT/ml, comparado con $1,8 \times 10^6$ UT/ml de pONY8.4RC-GFP producido en ausencia de proteína TRAP. Estos datos demuestran por primera vez que el sistema TRIP puede utilizarse para generar un vector retrovírico en el que se ha silenciado la traducción del transgén.

Caracterización fundamental de los requisitos de secuencia tbs para la represión mediada por TRAP.

Ejemplo 6. Ensayos de los requisitos de espaciadores cortos entre tbs y el codón de inicio de la traducción.

El primer experimento de caracterización de secuencias importantes en el sitio de unión a TRAP (tbs) preguntaba si la corta distancia de espaciado entre tbs y el codón de inicio de la traducción AUG era importante para la represión de la traducción. La configuración de tbs dentro de pCMV-tbsGFP y pONY8-tbsGFP es una configuración en la que tbs está separada del codón de inicio de traducción AUG de GFP por 9 nucleótidos. En otros sistemas artificiales de regulación génica, tales como Tet-ON/OFF, se ha demostrado que los parámetros de espaciado contribuyen a la funcionalidad. Para evaluar la importancia del espaciado a pequeñas distancias, se construyó una serie de variantes en las que 1 a 9 de estos nucleótidos espaciadores se había delecionado progresivamente. Además, se incrementó el espaciado a 10 y 11 nucleótidos en dos otras variantes. Finalmente, a la configuración tbs-9nt-AUG estándar se adjuntó una secuencia 5'-proximal de tallo-bucle (TB) obtenida del operón trpEDCFBA de *Bacillus subtilis*, que se ha demostrado que resulta importante para la unión de TRAP-tbs para el mecanismo de atenuación de la transcripción *in vivo* (McGraw AP, M. A., Major F, Bevilacqua PC, Babitzke P. RNA 15(1): 55-66, 2009). Se incluyó el mutante TB para someter a ensayo si podía potenciarse la represión mediada por TRAP. Se clonaron estas variantes en el genoma de vector pONY8.4RC-tbsGFP y se cotransfectaron con cantidades limitantes de pEF1a-coTRAP[H6] (proporción de 1:0,05) con el fin de las diferencias sutiles de represión de la traducción pudiesen cuantificarse más fácilmente.

Los resultados de estos experimentos se ilustran en la figura 13B. Ninguna de las variantes por delección de espaciador o las variantes por espaciador incrementado mostraba ninguna alteración de la represión mediada por TRAP en comparación con el espaciador de 9nt. La variante '0' mostraba una reducción de aproximadamente 2 veces de la expresión de GFP en comparación con las otras variantes +11 a +1, aunque ello ocurría en presencia o en ausencia de TRAP, indicando que la capacidad general de GFP de traducirse a partir de este ARNm variante era menos eficiente (probablemente debido a la delección de la secuencia Kozak de consenso óptima). Resulta interesante que la presencia del tallo-bucle 5' del operón *trp* natural anuló por completo la funcionalidad de tbs para reprimir la traducción en concierto con TRAP. Este inesperado resultado sugiere que, con independencia de las demás características de la configuración TB-tbs que permiten la funcionalidad *in vivo*, no presentan esta configuración artificial o no la presentan en el espaciado/contexto de secuencia correcto o que la unión de TRAP a TB-tbs en *Bacillus subtilis* sigue un mecanismo diferente de atenuación de la transcripción al de la atenuación de la traducción, siendo este último independiente del TB. Todos estos datos sugieren que la represión de la traducción dirigida por la unión de TRAP a tbs en este sistema artificial no se encuentra alterada por la corta distancia entre tbs y el codón de inicio de la traducción.

Ejemplo 6b. Ensayo del impacto de la posición de la tbs dentro de la 5'UTR de un casete de transgén en la represión mediada por TRAP.

Con el fin de caracterizar adicionalmente la importancia de la posición de tbs dentro de la 5'UTR del transgén con respecto a la actividad de represión mediada por TRAP, se construyó una serie de variantes de 5'UTR de pCMV-tbsGFP en la que se variaba la distancia relativa de tbs respecto al sitio Cap y el codón de inicio AUG (figura 24i). Además, se generó otro constructo en el que se habían insertado dos copias de tbs dentro de la 5'UTR con una secuencia intermedia de 34 nt entre las dos secuencias tbs. Esto se construyó con el fin de someter a ensayo si la represión mediada por TRAP-tbs podía mejorarse respecto a la configuración de tbs de copia única.

Se sometieron a ensayo los siete constructos de informador GFP variantes en la figura 24i para su capacidad de resultar reprimidos por TRAP bajo tres condiciones: ausencia de TRAP (HEK293T), pEF1a-coTRAPe[H6] (HEK293T

+ TRAP) cotransfectado transitoriamente y bajo condiciones de represión de TRAP máximas (HEK293T.TRIP[TRAP endógeno] + TRAP cotransfectado). Todas las variantes de tbs 5'UTR eran capaces de resultar reprimidas por TRAP[H6] en un factor de 10 a 100 veces. La reducción de la longitud de UTR cadena arriba a cero (es decir, la totalidad de la UTR comprendía únicamente una sola tbs) aparentemente no afectó a la represión mediada por TRAP; el constructo n° [1] era capaz de una represión ~ 2 Log de GFP por TRAP, aunque los niveles no reprimidos de GFP eran inferiores a los de los demás constructos.

El incremento del espaciado entre tbs y el codón de inicio AUG de 9 a 43 nt todavía permitió una represión mediada por TRAP de 10 veces mediante la tbs. La 5'UTR codificante de doble tbs (figura 24ii, constructo n°[7] no mejoró la represión mediada por TRAP en comparación con las variantes que contenían una sola tbs.

Estos datos demuestran que: [1] puede insertarse una sola tbs en cualquier sitio dentro de la 5'UTR, permitiendo cierto grado de represión mediada por TRAP de un transgén, [2] resulta preferente insertar la tbs más próxima al codón de inicio AUG a fin de facilitar la máxima represión mediada por TRAP, y [3] la longitud de la secuencia 5'UTR cadena arriba de la tbs puede reducirse a cero sin afectar a la magnitud de la represión.

Ejemplo 7. Identificación del número mínimo de repeticiones de [RAGNN] dentro de la tbs requerido para la represión mediada por TRAP de la traducción.

Se llevó a cabo el siguiente experimento con el fin de identificar el número mínimo de repeticiones de [RAGNN] necesario para permitir la represión mediada por TRAP. Un informe en la literatura utilizó la unión *in vitro* para indicar que tan sólo 5 repeticiones podrían resultar suficientes para permitir la unión de TRAP (Babitzke P, Y. J., Campanelli D., Journal of Bacteriology 178(17): 5159-5163, 1996). Se generó una serie de variantes de delección de tbs en la que se delecionaron progresivamente 1 a 7 repeticiones (figura 14iA). Se mantuvo la secuencia Kozak óptima en todas las variantes. Además, se realizó un cambio TG>AA en la tbs entre las repeticiones 10^a y 11^a; ello se llevó a cabo después de que otros trabajos sugiriesen que esta región podría contener un sitio donador de corte y empalme no canónico (esto más adelante demostró ser incorrecto) - datos no mostrados. Los constructos de tbs variante-informador GFP se cotransfectaron en células HEK293T con pEF1a-coTRAP[H6] (el primero en exceso molar 10:1 respecto al segundo) o pBlueScript, y se midió la expresión de GFP mediante citometría de flujo (figura 14iB). La modificación TG>AA de tbs no presentó ningún efecto detectable en la represión mediada por TRAP, ya que la variante tbsx11M permitió una represión de 1000 veces de la expresión de GFP. Las variantes tbsx10M, tbsx9 y tbsx8 también permitieron una represión de 1000 veces de la expresión de GFP, mientras que tbsx7 permitió una represión de 500 veces (figura 14iC y D). La delección de una repetición de RAGNN adicional que rendía tbsx6 resultó en una reducción adicional de la funcionalidad, ya que esta variante fue capaz de reprimir la expresión de GFP en 30 veces. Las variantes tbsx5 y tbsx4 mostraron una represión negligible en comparación con la ausencia de secuencia tbs. Estos datos demuestran claramente que los niveles más potentes de represión por la configuración TRAP/tbs requieren por lo menos 7x (preferentemente por lo menos 8) repeticiones de RAGNN, mientras que 6 repeticiones podrían permitir cierta inactivación útil de la expresión del transgén.

Ejemplo 8. Identificación del número de repeticiones de [RAGNNN] tolerado dentro de la tbs.

Aunque el consenso general es que la unión de TRAP a una tbs que contiene N₂ espaciadores entre las repeticiones de RAG es óptima, los estudios de unión *in vitro* de tbs-TRAP también han sugerido que los espaciadores nucleotídicos de tres nucleótidos entre las repeticiones de RAG de la tbs podrían resultar tolerados (Babitzke P, Y. J., Campanelli D, Journal of Bacteriology 178(17): 5159-5163, 1996). En efecto, las secuencias de tbs naturales observadas *in vivo* presentan espaciadores ocasionales más largos de dos nucleótidos, aunque es probable que ello se deba a que la interacción TRAP/tbs *in vivo* ha evolucionado bajo condiciones celulares específicas en las que pueden intervenir otras interacciones entre proteínas y/o presiones selectivas. Resulta posible que la interacción TRAP/tbs natural no requiera producirse a eficiencia máxima para cumplir con la funcionalidad biológica. Sin embargo, en el sistema TRIP artificial, resulta deseable que la interacción TRAP/tbs sea eficiente al máximo. Con el fin de someter a ensayo el nivel de tolerancia de la funcionalidad de la secuencia tbs 11x RAGNN a la sustitución en serie con repeticiones de RAGNNN, se diseñó una serie de secuencias de tbs variantes (figura 14iiA) y se clonaron en un genoma del vector VAIE que expresaba el transgén de COX2 (ver la figura 18i). Estos se basaron en la secuencia de tbs11M, sometida a ensayo en primer lugar en la figura 14iA. Las repeticiones de RAGNNN sustituyeron las repeticiones de RAGNN dentro de tbsx11M desde la posición central hacia afuera, rindiendo secuencias de tbs con 1x, 3x, 5x, 7x y finalmente 11x repeticiones de RAGNNN (observar que para la secuencia de tbs N₃x11M, sólo se encuentran presentes efectivamente 10 espaciadores NNN, ya que la mayor parte del espaciador repetido 3' distal no cuenta como espaciador). Estos plásmidos de genoma del vector se cotransfectaron transitoriamente en células HEK293T con componentes de empaquetamiento del vector VAIE +pEF1a-coTRAP[H6] y se recolectaron los sobrenadantes de vector (los títulos de vector de estos vectores de COX2 se indican posteriormente). Los lisados celulares de final de producción se analizaron mediante inmunotransferencia a COX2 para medir la represión del transgén en la célula en comparación con plásmido de relleno (no reprimido) (figura 14iiB).

Los datos indican que hasta tres repeticiones de RAGNNN en la tbs de 11x repeticiones permiten cierta represión detectable de la expresión del transgén dentro de las células de producción de vector; ello puede resultar suficiente para mejorar los títulos de vector en algunos casos, dependiendo de la magnitud del impacto de la proteína del

transgén sobre los títulos de vector sin el sistema TRIP. Una única repetición RAGNNN dentro de la tbs aparentemente es tan funcional como tbs con N₂x11 repeticiones.

Ejemplo 8b. Identificación del número de repeticiones de [RAGNNN] tolerado dentro de la tbs.

Se ha llevado a cabo trabajo adicional sobre el número de Ns que comprende el espaciador entre las repeticiones de RAG en la repetición de consenso RAGN₂₋₃ que permiten la represión mediada por TRAP. La figura 14iB presenta el análisis de expresión de COX2 en células de final de producción, aproximadamente 2 días después de la transfección. Para someter a ensayo si la expresión del transgén (COX2) en el contexto de las variantes de tbs N₃N₂ diferían en tiempos tempranos después de la transfección (en comparación tiempos tardíos), se analizaron lisados de células de producción a las 8 horas de la transfección, mediante inmunotransferencia a COX2 (figura 14iii). Estos datos indican que se produce un patrón similar de la expresión de COX2 a partir de la variante de tbs N₃N₂ tanto en tiempos tempranos como tardíos durante la producción del vector, es decir, la magnitud de la represión mediada por TRAP-tbs para una variante de tbs dada aparentemente es similar durante el curso de la producción del vector.

Para medir el impacto de los diferentes niveles de represión de COX2 de los genomas de vector que contienen variante de tbs N₃N₂ sobre los títulos de vector, los sobrenadantes en bruto recolectados se sometieron a ensayo de integración del ADN. La figura 14iv representa estos datos y muestra que los títulos de vector se incrementaron para las variantes de tbs N₃N₂ tbs en las que se producía una clara represión de COX2 en las células de producción; es decir, 'N₃N₂ x11 [3]', 'N₃N₂ x11 [1]' y 'N₂ x11 [0]'. Esto confirma que hasta tres repeticiones dentro de una tbs x11 compuesta de RAGNN pueden sustituirse por repeticiones de RAGNNN y conservan algo de actividad de represión mediada por TRAP, resultando en títulos de vector mejorados. Sin embargo, debe indicarse que la configuración de tbs RAGNN x8-11 sigue resultando preferente por motivos aparte de la producción incrementada de vector: proteína de transgén masivamente reducida asociada al producto vector que de otro modo podría conducir a una respuesta inmunológica contra el transgén durante la administración del vector.

Previamente se demostró que las variantes de tbs RAGNN x7-8 conservan una actividad de represión mediada por TRAP prácticamente máxima (figura 14i). Con el fin de someter a ensayo el impacto de la sustitución de una única repetición de RAGNN por RAGNNN dentro de estas variantes de tbs más cortas, se construyó una segunda serie de variantes de tbs N₃N₂ y se insertó en el genoma del vector de COX2 (figura 14vA). Estos plásmidos de genoma de vector se cotransfectaron transitoriamente en células HEK293T con componentes de empaquetamiento del vector VAIE +/- pEF1a-coTRAP[H6] y 8 horas después de la transfección, se analizaron los lisados celulares mediante inmunotransferencia a COX2 para medir la represión del transgén en la célula en comparación con el plásmido de relleno (no reprimido) (figura 14vB). Estos datos muestran que una tbs de 8 repeticiones que contiene una repetición de RAGNNN y siete repeticiones de RAGNN conserva actividad de represión mediada por TRAP. Las secuencias tbs de menos de 8 repeticiones que contienen una o más repeticiones de RAGNNN pueden presentar una actividad de represión mediada por TRAP más baja.

Ejemplo 8c. Caracterización de nucleótidos preferentes en las cinco posiciones del consenso de repetición de RAGNN.

Para caracterizar adicionalmente la repetición de consenso de RAGNN de la tbs, se sometió a ensayo el espaciador NN con cada nucleótido (G|A|T|U|C) en el contexto de una tbs de x11 repeticiones que comprende todas las repeticiones de GAGxx. Estas variantes de tbs se clonaron en pCMV-[tbs]GFP, sustituyendo la tbs x11M, y se sometieron a ensayo mediante cotransfección transitoria de células HEK293T +/- pEF1a-coTRAP[H6]. Tras 48 horas, las células se analizaron mediante citometría de flujo y se calcularon las puntuaciones de expresión de GFP (figura 23i). Ello reveló una preferencia para las pirimidinas en la posición NN. El orden general de funcionalidad era T|U|>C>G/A. Con el fin de someter a ensayo el nucleótido más funcional en la primera posición (R), se insertó cada nucleótido G, A, T|U| o C en repeticiones xAGAA dentro de tbs que comprendía x11, x8 o x6 repeticiones. Ello reveló que, en el contexto de la repetición de espaciador más débil (NN=AA), G era más funcional en la primera posición. T|U| en la primera posición en [TAGAA]x11 solo era mínimamente funcional, y A y C no eran funcionales en ninguna de estas repeticiones xAGAA. Por lo tanto, en el contexto de tbs que contiene repetición xAGAA en tándem, x debe ser G y no T.

A continuación, se sometió a ensayo la preferencia relativa de G o T en la 1ª posición del consenso de repetición de RAGNN. En el contexto de una tbs altamente funcional (11xGAGTT), se sustituyeron progresivamente las repeticiones de GAGTT por repeticiones de TAGTT. El incremento de las repeticiones de TAGTT (en sustitución de las repeticiones de GAGTT) redujo modestamente la función de represión de tbs. Dados los resultados de la figura 23i, lo anterior sugiere que en el consenso de repetición de RAGNN, de los nucleótidos variables, las posiciones más importantes para la funcionalidad son los espaciadores de NN, seguido de R. Los datos indican que las pirimidinas en las posiciones NN son las más preferentes.

Con el fin de caracterizar adicionalmente esta característica del consenso de repetición de RAGNN, se construyó otra serie de variantes de tbs en la que por lo menos un N=T, en el contexto de GAGxx (figura 23ii). Esto reveló que la represión máxima se consigue en el caso de que la primera N (posición 4 de RAGNN) sea preferentemente una pirimidina, y todavía más preferentemente, una T|U|. (Observar que no se sometió a ensayo GAGAT porque las

repeticiones en tándem de esta secuencia RAGNN resultan en múltiples codones ATG cadena arriba de la ORF del transgén, lo que probablemente atenuaría la expresión del transgén cadena abajo).

Muchos de estos resultados concuerdan con el informe publicado sobre las interacciones TRAP-tbs sometidas a ensayo *in vitro* o *in vivo* [Bacterias] (Babitzke P, Y. J., Campanelli D, Journal of Bacteriology 178(17): 5159-5163, 1996), aunque se observaron algunas diferencias. Por ejemplo, en el presente estudio, la repetición de RAGCC demostró ser un mediador altamente efectivo de represión de TRAP, mientras que otros han sugerido que este espaciador presenta una actividad reducida debido a la estructura secundaria (Xirasagar et al., J. Biol. Chem., Vol 273(42):27146-27153, oct .1998). Lo anterior indica que resulta necesario someter a ensayo empírico una secuencia de tbs específica que comprende repeticiones de RAGNN dentro del sistema de represión TRAP-tbs en células destinadas a la producción de vector (típicamente, aunque sin limitación, células basadas en HEK293), con el fin de someter a ensayo la magnitud de la represión posible por la tbs específica en presencia de TRAP. Conjuntamente, los datos en dicho estudio revelaron que los nucleótidos preferentes del consenso de repetición de RAGNN son:

- una pirimidina en por lo menos una de las posiciones espaciadoras NN,
- una pirimidina en por lo menos la primera de las posiciones espaciadoras NN,
- pirimidinas en ambas posiciones espaciadoras NN,
- preferentemente G en la posición R.

Ejemplo 9. Ensayo de la configuración TRAP/tbs en casetes de transgén en los que la traducción es dependiente de un IRES.

Los vectores multicistrónico son herramientas útiles para administrar más de un gen en células diana de los pacientes. Por lo tanto, resultaría ventajoso poder reprimir múltiples transgenes dentro de un genoma de vector utilizando el sistema TRIP, incluyendo los dependientes de elementos IRES. Para someter a ensayo si el sistema TRIP puede aplicarse a casetes de expresión de transgén en los que el ORF distal es dependiente de un sitio interno de entrada ribosómica (IRES), se construyeron los vectores bicistrónico indicados en la figura 15A. Brevemente, se insertó una secuencia codificante del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y el elemento IRES del VEMC en pCMV-tbsGFP, dando lugar al casete génico bicistrónico VEGF-IRES-tbsGFP codificado dentro de pCMV-Vi-tbsx11GFP. Se realizaron dos constructos de control adicionales que contenían únicamente 4 repeticiones de [RAGNN] o sin repeticiones; no se predijo que fuesen reprimibles por TRAP. Los constructos se cotransfectaron en células HEK293T con plásmido de relleno o pEF1a-coTRAP[H6] y se evaluó la expresión de GFP mediante citometría de flujo. Se muestran estos datos en la figura 15B. El nivel de expresión de GFP desde la posición distal en el casete bicistrónico era aproximadamente 7 veces más bajo que el del constructo de cistrón único, lo que no es atípico de las configuraciones de gen bicistrónico. El nivel de expresión de GFP en las células transfectadas con pCMV-Vi-tbsx11GFP era 2 veces adicionales más bajo, indicando que la situación de la secuencia de tbs presentaba una pequeña reducción de la eficiencia de traducción dependiente de IRES. El nivel de expresión de GFP en las células transfectadas con pCMV-Vitbsx11G + pEF1a-coTRAP[H6] era 17 veces más bajo que con plásmido de relleno, demostrando que la configuración TRAP/tbs puede funcionar en el contexto de la entrada interna ribosómica. Además, dicha funcionalidad era dependiente de la presencia de tbs, así como de la presencia de la proteína TRAP, ya que el control y los constructos de 4x repeticiones no respondía significativamente a TRAP. Estos datos demuestran por primera vez la nueva utilización de TRAP/tbs en la regulación de la expresión génica mediante el control de la traducción dependiente de IRES. (los datos en la figura 19i y 19ii demuestran adicionalmente que múltiples ORF dentro de ARNm multicistrónicos pueden reprimirse simultáneamente utilizando el sistema TRIP)

Represión del transgén de GFP en células de producción de vector SIN que contiene WPRE mediante la configuración TRAP/tbs

Ejemplo 10. Producción de vector lentivíricos SIN que contenía WPRE utilizando el sistema TRIP.

Se aplicó el sistema TRIP a la producción de un vector SIN que también contenía el elemento post-transcripcional de marmota (WPRE, por sus siglas en inglés). El genoma del vector inicial (pONY8.4RC-tbsGFP) utilizado para ejemplificar la represión de la traducción del transgén utilizando la configuración TRAP/tbs no era un vector SIN y no contenía un elemento regulador post-transcripcional (PRE), una característica típica de los vectores retrovíricos contemporáneos y otros sistemas de vector vírico. El WPRE se ha demostrado que funciona reduciendo la lectura a través de sitios de poliadenilación Higashimoto T, U. F., Perumbeti A, Jiang G, Zarzuela A, Chang LJ, Kohn DB, Malik P., Gene Therapy 14(17): 1298-1304, 2007). Sin embargo, informes anteriores sugieren que WPRE podría actuar a nivel del ARN de otros modos. Para someter a ensayo si la configuración TRAP/tbs podría utilizarse para reprimir la expresión del transgén a partir de un genoma de vector-SIN que contenía WPRE, se construyó el genoma de vector pONY8.9RCTG(+WPRE) y se sometió a ensayo en la represión de la expresión de GFP en células HEK293T. La figura 16 muestra que la inclusión de WPRE en un genoma de vector-SIN no presenta ningún efecto adverso sobre el sistema TRIP. La represión de GFP a partir de pONY8.4RC-tbsGFP y pONY8.9RCTG(+WPRE) era equivalente.

Utilización de sistema TRIP para incrementar los títulos de producción de vectores que expresan transgenes terapéuticos

Ejemplo 11. Producción de un vector expresante de Factor VIII_h utilizando el sistema TRIP.

ReQuinate®, desarrollado para el tratamiento de la hemofilia A, resulta difícil de producir en células HEK293T debido a que se ha demostrado que el transgén Factor VIII_h inhibe severamente la incorporación de la cubierta VEV-G en los viriones de vector. Los títulos de vector de ReQuinate® son bajos (ver la figura 3i para los datos del experimento de mezcla), a menos que un promotor específico de tejido que no se encuentra activo en las células HEK293T se utilice para controlar la expresión del Factor VIII_h (Radcliffe PA, S. C., Wilkes FJ, Custard EJ, Beard GL, Kingsman SM, Mitrophanous KA, Gene Therapy 15(4): 289-297, 2008). Se aplicó el sistema TRIP a ReQuinate® para someter a ensayo si los títulos de vector podían potenciarse mediante la represión de la expresión del Factor VIII_h en células de producción HEK293T. Los genomas de vector ReQuinate-tbs y ReQuinate-con se construyeron (figura 17i), en los que la 5'UTR en el genoma original de ReQuinate® se sustituyó con la misma 5'UTR procedente de los vectores de tbs-informador GFP (ilustrado en la figura 6). El genoma de vector ReQuinate-con contenía la misma 5'UTR que ReQuinate-tbs, excepto en que la tbs se encuentra reorganizada; esto se llevó a cabo de manera que la traducción del Factor VIII_h a partir de ARNm negativo para tbs era en el contexto de una 5'UTR similar en términos de longitud de secuencia y contenido de nucleótidos en comparación con el ARNm que contenía tbs. Se construyeron estos vectores en células HEK293T utilizando ADN plasmídico de genoma de vector en un exceso molar de 5 veces respecto a pEF1a-coTRAP[H6]. Los sobrenadantes de vector filtrados se sometieron a ensayo de integración del ADN para determinar los títulos. Los sobrenadantes de vector también se concentraron ~100 veces, se sometieron a ensayo PERT para cuantificar el número de partículas y se analizaron números iguales de partículas de vector para el contenido de VEV-G mediante inmunotransferencia. Los datos de estos análisis se muestran en la figura 17ii. El sistema TRIP mejoró el título de integración de ADN del genoma de vector expresante de Factor VIII_h en 30 veces, en comparación con ReQuinate-tbs producido en presencia de TRAP[H6] y ReQuinate®. El grado de incorporación de VEV-G en las partículas de vector se incrementó masivamente utilizando la configuración TRAP/tbs y ello se correlacionó estrechamente con el título de vector. Resulta interesante que la incorporación de VEV-G en las partículas de vector realizada con ReQuinate-con también se incrementó ligeramente y se observó un pequeño incremento concomitante de título de vector +pEF1a-coTRAP[H6]; ello podría haberse debido a la expresión subóptima del Factor VIII_h a partir de este constructo.

Ejemplo 12. Producción de vectores expresantes de COX2 y/o FPR utilizando el sistema TRIP.

En relación al desarrollo de vectores retrovéricos para tratar el glaucoma, se evaluaron varios transgenes para reducir la presión intraocular, incluyendo el receptor de la prostaglandina F (FPR), que es un receptor para la prostaglandina F_{2α} que está codificado por el gen de PTGFR, y la ciclooxigenasa-2 (COX-2), el enzima limitante de la velocidad en la biosíntesis de las prostaglandinas. La administración de ambos genes simultáneamente (mediante vectores génicos separados o mediante un vector génico bicistrónico) se espera que podría resultar beneficioso para los pacientes de glaucoma. Sin embargo, se ha encontrado que los títulos de vectores codificantes de estos transgenes están marcadamente reducidos en comparación con los títulos de vector génico marcador. Se ha demostrado que por lo menos parte de este efecto se debe a los productos del transgén debido a que la mezcla de estos genomas de vector con un genoma de vector de lacZ durante la producción del vector resulta en la reducción del título de vector-lacZ (ver la figura 3ii).

Con el fin de someter a ensayo si el sistema TRIP podría incrementar los títulos de vector, se clonó la secuencia variante tbsx11 m (ver la figura 14iA) en los genomas de vector de transgén único ilustrados en la figura 18i. Se produjeron preparaciones de vector vírico en células HEK293T, cotransfectando también pEF1a-coTRAP[H6] o plásmido de relleno en una proporción molar de 1:0,2 genoma de vector:plásmido de TRAP. Las preparaciones de vector se titularon mediante ensayo estándar de integración de vector (figura 18iiiA) y se obtuvieron los lisados celulares de tanto células de producción de vector de COX-2 como de células transducidas con vector de COX-2 con el fin de evaluar la expresión de COX-2 a partir de la unidad de transcripción que contenía tbs en las células diana. Los datos de estos análisis se muestran en las figuras 18iiB y 18iiC, respectivamente. Los títulos del vector de tbs-COX-2 eran 100 veces más elevados que los del vector de COX-2 no modificado (figura 18iiA) y el nivel de COX-2 en las células de producción estaba inversamente correlacionado con el título (figura 18iiB). La expresión de COX-2 pudo detectarse a un nivel robusto únicamente dentro de células diana que habían sido transducidas con vector producido utilizando el sistema TRIP, demostrando que la secuencia tbs no afectaba a la expresión del transgén en las células diana (figura 18iiC). Se incrementó el título de vector de FPR producido utilizando el sistema TRIP en 24 veces en comparación con vectores estándares (figura 18iii); nuevamente, esto era dependiente tanto de TRAP como de tbs en el sistema.

Para someter a ensayo un vector multicistrónico que expresaba tanto COX-2 como FPR, se clonó la secuencia tbsx11M en plásmidos de genoma de vector ilustrados en la figura 19i; se crearon plásmidos de genoma de vector bicistrónico codificantes de COX-2 y FPR en cualquiera de las posiciones +/- tbs. Se produjeron preparaciones de vector vírico en células HEK293T bajo condiciones estándares, cotransfectando también pEF1a-coTRAP[H6] o plásmido de relleno en una proporción molar de 1:0,2 de genoma de vector:plásmido de TRAP. Las preparaciones de vector se titularon mediante ensayo estándar de integración del ADN y se obtuvieron los lisados celulares de las células de producción de vector (figura 19ii). Se llevó a cabo la inmunotransferencia de los lisados celulares utilizando anticuerpo de COX-2 únicamente, ya que no hay anticuerpo disponible comercialmente de FPR. Estos datos muestran que el ARNm multicistrónico puede reprimirse simultáneamente en más de una posición de ORF utilizando el sistema

TRIP. Los resultados de esta represión permitieron un incremento de 100 veces del título de vector (comparar pKCMV-COX2-i-FPR [+ relleno] con pKCMV-tbsCOX2-i-tbsFPR [+pEF1a-coTRAP[H6]]).

Ejemplo 13. Producción de vectores de OXB-102 utilizando el sistema TRIP.

OXB-102 es un vector VAIE que se está desarrollando para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson y que expresa 3 proteínas que participan en la biosíntesis de la dopamina: la tirosina hidroxilasa, la GTP-ciclohidrolasa y la L-aminoácido aromático descarboxilasa (descritos en el documento nº WO 2013/061076). Aunque se conoce que estas enzimas no presentan un impacto negativo sobre los títulos de vector, tal como se ha indicado anteriormente, podría resultar beneficioso reprimir la expresión del transgén dentro de las células de producción de vector desde la perspectiva del procesamiento/concentración del vector, así como de la administración de una preparación de vector menos inmunogénica en el paciente. Por lo tanto, se clonó la secuencia tbsx11M en el ORF 5'-proximal del plásmido de genoma de vector OXB-102 multicistrónico, tal como se ilustra en la figura 20i. En el vector resultante, la traducción del gen de fusión tirosina hidroxilasa:GTP-ciclohidrolasa 1 (TH-CH1) se predice que resultaría reprimida por TRAP únicamente en células de producción de vector. Se produjeron preparaciones de vector vírico en células HEK293T, cotransfectando también pEF1a-coTRAP[H6] o plásmido de relleno en una proporción molar de 1:0,2 genoma de vector:plásmido de TRAP. Las preparaciones de vector se titularon mediante ensayo estándar de integración del ADN y se obtuvieron los lisados celulares de las células de producción de vector. La figura 20iiA y 20iiB en efecto muestran que la proteína de fusión TH-CH1 se encuentra reprimida en las células de producción de vector, según la inmunotransferencia utilizando anticuerpos de tanto TH como CH1 (figura 20iiB), pero se detecta fácilmente en células transducidas, según la inmunotinción con anticuerpos anti-TH.

Ejemplo 14. Producción de vectores lentivíricos basados en VIH-1 utilizando el sistema TRIP.

Los presentes inventores intentaron demostrar la utilidad del sistema TRIP en la producción de los vectores lentivíricos basados en VIH-1. La secuencia tbsx11M se clonó en un genoma estándar de vector VIH-1 codificante de GFP bajo el control del promotor del CMV (figura 25iA). Se produjeron vectores codificantes de GFP mediante cotransfección transitoria de células HEK293T con plásmidos de componentes de empaquetamiento en la proporción en masa siguiente: 4,5 µg de genoma de vector, 1,5 µg de gagpol, 1,1 µg de rev, 0,7 µg de vev-g CON 0,56 µg de pEF1a-coTRAP[H6] (+TRAP) o 0,56 µg de pBlueScript (-), utilizando 25 µl de Lipofectamina 2000CD por cada placa de 10 cm (sembrada a razón de $3,5 \times 10^6$ células/placa 24 horas antes de la transfección). Los cultivos se incubaron durante la noche antes de añadir butirato sódico hasta una concentración final de 10 mM durante 5 horas. A continuación, se sustituyó el medio y los cultivos se incubaron hasta 2 días después de la transfección, cuando se recolectaron los sobrenadantes de vector en bruto, se filtraron (0,2 µm) y se almacenaron a -80°C. Las células de final de producción se analizaron mediante citometría de flujo y se calculó la puntuación de expresión de GFP. Se titularon los sobrenadantes de vector mediante transducción de células HEK293T seguido de análisis mediante citometría de flujo. La figura 25iiB muestra tanto las puntuaciones de expresión de GFP (MIF x % de GFP) para las células de final de producción y los títulos de vector producidos. Se reprimió la expresión de GFP en 2 Log únicamente en el caso de que el genoma de vector VIH-1 contuviese la secuencia tbs tal como se ha indicado y se hubiese reintroducido TRAP. Sin embargo, los títulos de vector no resultaron afectados por estas modificaciones. Estos datos demuestran que, en principio, cualquier transgén puede ser reprimido en células de producción de vector basadas en VIH-1 utilizando el sistema TRIPLenti.

Para evaluar si el título de un vector basado en VIH-1 codificante de un gen terapéutico podía mejorarse utilizando el sistema TRIPLenti, se insertó el tbs tbsx11M en la 5'UTR del casete de transgén de un genoma de vector VIH-1 codificante de 5T4-CAR (figura 25iiA); este vector terapéutico es para la modificación genética de las células T, permitiendo que reconozcan y eliminan células tumorales que expresan el antígeno 5T4. El vector resultante VIH-tbs-5T4_h.CAR se produjo bajo las mismas condiciones indicadas anteriormente (para el vector de GFP), es decir, la cotransfección de células HEK293T con componentes de vector +/- pEF1a-coTRAP[H6]. Los sobrenadantes de vector se titularon mediante ensayo de integración de ADN en células HEK293T. La figura 25iiB ilustra los resultados de este experimento; el título de VIH-tbs-5T4_h.CAR era 30 veces mayor al coexpresar TRAP[H6] en células de producción en comparación con el control (pBlueScript). Estos datos demuestran que la expresión de 5T4.CAR dentro de las células de producción resulta perjudicial a la producción de vector activo y que el sistema TRIP supera este problema mediante la represión de la expresión del transgén.

Ejemplo 15. La configuración TRAP-tbs no afecta a los niveles de ARNm del transgén en el citoplasma.

La configuración TRAP-tbs es capaz de una represión extremadamente potente del transgén y se cree que actúa únicamente al nivel de la traducción. Para someter a ensayo si el pool de estado estable de ARNm codificante de tbs resulta afectado en presencia de TRAP (p.ej., un posible efecto desestabilizador), que también podría contribuir a la represión de la expresión del transgén, se midieron los niveles relativos de ARN citoplasmático del transgén en células HEK293T transfectadas con pCMV-[tbs]GFP +/-pEF1a-coTRAP[H6]. Las células se transfectaron y se midió la expresión de GFP mediante citometría de flujo 2 días después de la transfección (figura 26A). Se fraccionaron réplicas de cultivos, se extrajeron los núcleos y se purificó el ARN citoplasmático total utilizando un kit QIAGEN RNaseasy. El ARN se trató con ADNasa antes de llevar a cabo la qRT-PCR utilizando una sonda FAM/juego de cebadores para una secuencia diana de GFP (figura 26B). De acuerdo con datos anteriores, la configuración TRAP-tbs era capaz de

reprimir la expresión de GFP en células HEK293T en 2 Log. Sin embargo, el nivel de detección del ARNm de GFP dentro del citoplasma variaba en no más de ~2 veces en todas las condiciones (todos los valores de Ct variaban menos de 1,5 ciclos). Estos datos confirman que el mecanismo más probable de represión de transgén mediada por TRAP está en la traducción.

5 *Ejemplo 16. Comparación de la represión de transgén bicistrónico mediada por TRAP/tbs en células de producción de vector a partir de vectores basados en VIH-1 codificantes de promotores constitutivos frente a promotores específicos de tejido.*

10 Para someter a ensayo la represión mediada por TRAP (al nivel de la traducción) en comparación con la represión de transgén al nivel de la transcripción, se construyeron genomas de vector basado en VIH-1 en el que la transcripción del transgén estaba controlada por promotores específicos de tejido (VMD2; expresión en células fotorreceptoras (Esumi N. et al., J. Biol. Chem. 279: 19064-73, 2004), mAlbAT; expresión en células hepatocitos del hígado (Kramer, M.G. et al. Mol. Ther. 7: 375-385, 2003)) o el promotor del CMV constitutivo. El casete del transgén era bicistrónico, codificante de luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*) en el primer ORF y GFP en el 2º ORF con el elemento IRES de VEMC insertado entre los dos ORF. Se insertaron secuencias de tbs único (x11M) cadena arriba de ambos genes informadores. Se generaron constructos de CMV-promotor alternativos en los que sólo el 1º o 2º ORF estaba regulado por TRAP-tbs, y controles sin ninguna secuencia tbs o ningún promotor (figura 27i).

20 Se utilizaron los siete genomas de vector para producir partículas de vector en células HEK293T. Las células se cotransfectaron con plásmido de genoma de vector más componentes de empaquetamiento y pEF1a-coTRAP[H6] o pBluescript (control). Además, se añadió pGL3-control (*Renilla reniformis* controlada por promotor del SV40, luciferasa) (proporción 1:40 respecto al ADN total), proporcionando un control de la eficiencia de transfección. Las proporciones de los plásmidos eran: genoma (4,5) | GagPol (1,5) | Rev (1,1) | VSVG (0,7) | TRAP/Bluescript (0,56) | control de pGL3 (0,23). Las transfecciones se produjeron a escala de 96 pocillos en placas por duplicado, con cada condición por triplicado. Un día después de la transfección, se indujeron los cultivos con butirato sódico 10 mM durante 5 a 6 horas (un método típico de producción de vector) antes de sustituir el medio por medio fresco. Las células de final de producción se analizaron mediante citometría de flujo para generar Puntuaciones de expresión de GFP (MIF x % de GFP) a fin de medir la expresión en la 2º posición o se lisaron en tampón de lisis de acuerdo con el protocolo de ensayo de informador Dual luciferase® a fin de medir la expresión en la 1º posición. Los lisados se analizaron para la expresión de la luciferasa de luciérnaga utilizando un lector de placas Dynex MLX siguiendo el protocolo anterior utilizando el método del fabricante.

35 Los datos de expresión para los casetes bicistrónico en las células de producción de vector se presentan en la figura 27ii. Tal como se esperaba, no se observó represión de luciferasa o GFP a partir de pVIH-CMV-Luc-iGFP al suministrar TRP, debido a la ausencia de tbs. La represión de la expresión de luciferasa se observó a partir de pVIH-CMS-tbsLuc-itbsGFP y pVIH-CMV-tbsLuc-iGFP, pero no a partir de pVIH-CMV-Luc-itbsGFP. La represión de la expresión de GFP se observó a partir de pVIH-CMV-tbsLuc-itbsGFP y pVIH-CMV-Luc-itbsGFP, pero no a partir de pVIH-CMV-tbsLuc-iGFP. Resulta interesante que, mientras que el genoma de vector sin promotor pVIH-Null-tbsLuc-itbsGFP expresaba la luciferasa a niveles 100 veces inferiores a las variantes de CMVp, este nivel de expresión pudo reprimirse con TRAP. Es probable que este nivel de expresión más bajo de luciferasa (en ausencia de TRAP) se derive del ARN genómico de vector de longitud completa de una manera dependiente de CAP, es decir, el escaneo de ribosomas desde el extremo 5' del ARN de vector de longitud completa. De esta manera, TRAP puede unirse a tbs en el ARN del genoma del vector de longitud completa y bloquear la expresión del transgén a partir de este ARN más largo, así como la del transcrito interno. Lo anterior se pone adicionalmente de manifiesto por el hecho de que se expresan niveles elevados de GFP en pVIH-Null-tbsLuc-itbsGFP, presumiblemente debido a que el elemento IRES controla únicamente la traducción de GFP. TRAP fue capaz de reprimir esta expresión de GFP a partir del ARN de genoma de vector de longitud completa derivado de pVIH-Null-tbsLuc-itbsGFP. Lo anterior resulta corroborado por el hecho de que los constructos específicos de tejido pVIH-VMD2-tbsLuc-itbsGFP y pVIH-mAlb-hAAT-tbsLuc-itbsGFP, produjeron niveles similares de GFP en comparación con pVIH-Null-tbsLuc-itbsGFP (en ausencia de TRAP), a pesar de que la expresión de luciferasa era baja (en comparación con los constructos de CMVp), demostrando que la mayor parte de la expresión de GFP no procedía del casete controlado por el promotor interno. Este nivel de expresión de GFP (a partir del ARN del genoma de vector de longitud completa) también podía ser eficientemente reprimido por TRAP. Finalmente, los niveles de expresión de luciferasa a partir de pVIH-VMD2-tbsLuc-itbsGFP y pVIH-mAlb-hAAT-tbsLuc-itbsGFP eran ~2 veces superiores a los de pVIH-Null-tbsLuc-itbsGFP, indicando que estos promotores específicos de tejido son promotores con ligeras pérdidas ("leaky") en las células HEK293T. Incluso este nivel bajo de expresión de luciferasa resultaba reprimido por TRAP.

60 Estas observaciones se resumen en el esquema presentado en la figura 27iii. Estos datos demuestran que el sistema TRIP es capaz de reprimir simultáneamente los transgenes multicistrónicos, y presenta ventajas respecto a la utilización de promotores específicos de tejido. Para la producción de vectores retrovíricos, deben transcribirse grandes cantidades de ARN de genoma de vector de longitud completa dentro de una célula, aunque los presentes inventores demuestran en la presente memoria que la traducción de la proteína del transgén resulta posible a partir de esta molécula de longitud completa, particularmente en el caso de que se utilice un elemento IRES. Debido a que 65 el sistema TRIP media en la represión al nivel de la traducción, es capaz de reprimir la expresión del transgén a partir del ARN genómico del vector de longitud completa, así como el ARNm del casete del transgén derivado internamente.

Ejemplo 17. Demostración de la utilidad de la represión del transgén mediada por TRAP/tbs en la producción de un vector vírico a base de ADN, estudio de caso 1 - vectores basados en VAA.

5 El trabajo siguiente describe el sistema de producción de vector TRiVAA, que utiliza la configuración TRAP-tbs de una manera similar a la indicada para los sistemas de vector vírico basados en ARN, tales como retro/lentivirus. La figura 28i muestra un ejemplo no limitativo del sistema TRiVAA, que comprende células de producción (p.ej., células expresantes de E1 adenovírico, células basadas en HEK293, células basadas en PER.C6) que contienen los casetes de expresión siguientes: [1] un genoma de vector VAA modificado de manera que se inserta una tbs dentro de la 5'UTR del transgén (y/o entre un IRES y el transgén cadena abajo), [2] un plásmido de expresión de repcap, [3] funciones de ayudante (p.ej., E2A adenovírico, E4orf6, genes VA) y [4] un casete de expresión de TRAP (línea celular de TRAP transfectada transitoriamente o estable).

15 Con el fin de someter a ensayo si la expresión del transgén podía reprimirse en células de producción de vector VAA, se aplicó el sistema TRiPVAA a la producción de un vector (sc)VAA-(CMV)-tbsGFP autocomplementario (serotipo 2) en células HEK293T. En primer lugar, se sometió a ensayo el impacto de la coexpresión de repcap y funciones de ayudante de adenovirus sobre la represión mediada por TRAP, y se comparó con el plásmido informador pCMV-tbsGFP (figura 28ii). Se transfectaron células HEK293T por triplicado con pscVAA-GFP o pscVAA-tbsGFP o pCMV-tbsGFP, en diferentes combinaciones de pEF1a-coTRAP[H6], pRepCap2 y pAyudante (todas a una proporción de masas equivalente de 2 µg por cada placa de 10 cm, a menos que se indique lo contrario. para pEF1a-coTRAP[H6] - ver la figura 28ii). Tal como se esperaba, la expresión de TRAP no tuvo ningún impacto sobre la expresión de GFP por psVAA-GFP, que no presenta una tbs. La expresión de GFP a partir de pscVAA-tbsGFP fue reprimida en prácticamente 3 Log por la presencia de TRAP (plásmidos de TRAP y genoma de vector scVAA en proporción 1:1). La coexpresión de pAyudante y pRepCap2 no afectó a este nivel de represión mediada por TRAP. Al transfectar juntos pscAAV-tbsGFP, pRepCap2, pAyudante y pEF1a-coTRAP[H6] (es decir, bajo condiciones en las que se producirían partículas de vector scVAA-tbsGFP), el nivel de represión de GFP por TRAP era superior a 300 veces. La titulación de 10 veces de pEF1a-coTRAP[H6] (proporción con genoma entre 1:1 [2 µg] y 10:1 [0, µg]) bajo condiciones de producción de scVAA-tbsGFP indica que la represión de 3 Log podría resultar posible con mayores introducciones de plásmido de TRAP. Estos datos demuestran que la expresión de un casete de transgén dentro de un genoma de vector VAA puede reprimirse en por lo menos 300 veces utilizando el sistema TRiPVAA y que las funciones de empaquetamiento/ayudante de por sí no inhiben la represión mediada por TRAP.

35 Para demostrar que las partículas de vector VAA funcionales pueden producirse utilizando el sistema TRiPVAA, se produjeron partículas de vector scVAA2-[tbs]GFP a escala de placa de 10 cm mediante la transfección de células con genomas de pscVAA2-GFP (+/- tbs), pRepCap2, pAyudante y pEF1a-coTRAP[H6] (TRAP) o pBluescript (-) (2 µg de todos los ADN). Tras 53 horas, las células se congelaron-descongelaron y se purificaron las partículas de vector utilizando un kit Virabind™, se concentraron hasta un volumen final de 100 µl de PBS y después se titularon mediante transducción de células HEK293T y HEPG2 (figura 28iii). Estos datos demuestran que pueden producirse vectores VAA-GFP en títulos equivalentes con el sistema TRiPVAA a los obtenidos mediante el método estándar, indicando que la modificación de tbs y la coexpresión de TRAP no bloquea intrínsecamente la biología del vector VAA. Por lo tanto, este trabajo demuestra que la represión potente de la expresión del transgén en las células de producción de vector VAA utilizando el sistema TRiPVAA resulta posible y que si la actividad del producto del transgén resulta perjudicial para el título o potencia de las partículas de vector VAA, esta actividad se verá muy disminuida.

45 Para demostrar que el sistema de vector TRiPVAA es capaz de reprimir un transgén altamente tóxico/problemático codificado por un genoma de vector VAA en células de producción, se construyó scVAA2-tbsBarnasa (figura 28ivA). La barnasa es una potente ARNasa bacteriana que resulta tóxica para las células eucarióticas al expresarse y se ha demostrado que compromete la producción de vector VAA a menos que se silencie (Chen H., Mol Ther Nuc Acids., 1, e57; doi:10.1038/mtna.2012.48, nov., 2012). Se transfectaron cultivos de células HEK293T y HEK293T.TRiP[3D] con los componentes de empaquetamiento pRepCap2 y pAyudante (sin pEF1a-coTRAP[H6]), excepto en que se mezclaron masas iguales de plásmidos de genoma pscAAV2-GFP (figura 28ivB) y pscAAV2-tbsBarnasa, a fin de observar el efecto de la barnasa sobre la expresión de GFP, o sólo se transfectó pscVAA-(CMV)-GFP. Se obtuvieron fotografías de estos cultivos 24 horas después de la transfección, que se muestran en la figura 28v: i-ii. Los cultivos de HEK293T y HEK293T.TRiP[3D] transfectados con pscVAA-(CMV)-GFP solo produjeron niveles elevados de expresión de GFP (figura 28v: ii). Sin embargo, los cultivos de HEK293T cotransfectados con genoma pscVAA-(CMV)-GFP y pscVAA-(CMV)-tbsBarnasa expresaron niveles despreciables de GFP (figura 28v: i), demostrando que la expresión de barnasa había resultado en un efecto global de expresión de proteína reducida, presumiblemente debido a la degradación del ARNm y ARN ribosómico del transgén. En contraste, los cultivos de HEK293T.TRiP transfectados con la misma mezcla de ADN, permitieron cierta expresión sustancial de GFP, indicando que los niveles endógenos de TRAP[H6] en estas células habían inhibido la expresión de barnasa. Probablemente es posible mejorar la represión de la barnasa mediante el aislamiento de líneas celulares estables con niveles incluso más elevados de TRAP endógeno. El modelado de la barnasa como proteína de transgén tóxica expresada durante la producción de vectores víricos representa el peor escenario posible, en el que la síntesis *de novo* de proteína (incluyendo los componentes del vector vírico) ha sido efectivamente cerrada. Dada la observada recuperación moderada de la expresión de GFP en las células HEK293T.TRiP, lo anterior sugiere que la expresión de las proteínas componentes del vector VAA

también se produce, y que la producción de partículas de vector VAA codificantes de barnasa resulta posible en líneas celulares de TRAP estables.

5 *Ejemplo 18. Demostración de la utilidad de la represión del transgén mediada por TRAP/tbs en la producción de un vector vírico basado en ADN, estudio de caso 2 - vectores basados en adenovirus*

10 El trabajo siguiente describe el sistema de producción de vector TRIPAdeno, que utiliza la configuración TRAP-tbs de una manera similar a la indicada para los sistemas de vector vírico basados en ARN, tales como los retro/lentivirus y para los vectores VAA basados en ADN (Ejemplo 17). La figura 29i muestra un ejemplo no limitativo del sistema TRIPAdeno, que comprende células de producción (p.ej., células expresantes de E1 adenovírico, células basadas en HEK293, células basadas en PER.C6) que contienen los casetes de expresión siguientes: [1] un genoma de vector basado en adenovirus modificado de manera que se inserta una tbs dentro de la 5'UTR del transgén (y/o entre un IRES y el transgén cadena abajo), [2] un plásmido de expresión de TRAP (línea celular de TRAP transfectada transitoriamente o estable). Opcionalmente, puede cointroducirse un virus ayudante con delección de E1 para la producción de vector dependiente de ayudante.

15 Para demostrar que la expresión de transgén puede reprimirse en el sistema TRIPAdeno durante la recombinación de ADN del vector en células de mamífero, generando de esta manera genomas de vector Adeno-tbsTransgén de longitud completa, se construyeron los plásmidos lanzadera pAdeno-CMV-GFP y pAdeno-tbsGFP (kit RAPAd®, Cell BioLabs) (figura 29iiA). Estos contenían el lado izquierdo del genoma de adenovirus (con delección de E1) codificante del casete del transgén. Estos plásmidos lanzadera se cotransfectaron en células HEK293T con pEF1a-coTRAP[H6] (TRAP) o pBlueScript (-), y, en transfecciones paralelas, con pacAd5 9.2-100 (RAPAd® kit, Cell BioLabs), que contiene secuencias homólogas solapantes con las secuencias de Ad5 en las lanzaderas, y el resto del genoma de Ad5 (con delección de E3) hasta la ITR derecha (figura 29iiB). La proporción en masa de plásmido lanzadera a plásmido de TRAP era de 5:1. Se incubaron réplicas de cultivo durante 48 horas y después se analizaron para la expresión de GFP mediante citometría de flujo (se generaron Puntuaciones de expresión de GFP; MIF x % de GFP) o se incubaron hasta observar efecto citopático (-14 días). Se prepararon reservas en bruto de Adeno-CMV-GFP y Adeno-CMV-tbsGFP mediante congelación-descongelación de las células y eliminación de los residuos celulares, seguido de titulación en células HeLa.

20 Los datos en la figura 29iiB muestran la expresión global de GFP en los cultivos 48 horas después de la transfección y demuestran que la expresión del transgén puede reprimirse a partir de los plásmidos lanzadera Ad en 2 Log únicamente en el caso de que tbs se encuentre presente dentro de la 5'UTR del transgén y en presencia de TRAP. La cotransfección con pacAd5 9.2-100 no afectó a los niveles de represión, demostrando de esta manera que resulta posible reprimir la expresión del transgén durante la recombinación del ADN del vector en células de mamífero. Esto representa una etapa importante hacia la generación de vectores adenovíricos en células de mamífero, ya que la expresión de transgenes tóxicos de otro modo negaría la capacidad de recuperar vectores recombinantes.

25 Para someter a ensayo si el sistema TRIPAdeno puede reprimir la expresión del transgén durante la amplificación del vector Ad, se transdujeron células HEK293T o HEK293T.TRIP[3D] (de expresión estable de TRAP[H6]) con Adeno-CMV-GFP y Adeno-CMV-tbsGFP en una MDI de 0,01. Se analizaron réplicas de cultivo para la expresión de GFP durante la amplificación del vector en diferentes puntos temporales después de la inoculación y se generaron puntuaciones de expresión de GFP (MIF x % de GFP). Los resultados de este experimento se muestran en la figura 29iii, y muestran que la expresión de GFP se encuentra reprimida >400 veces durante la amplificación de Adeno-CMV-tbsGFP únicamente en la línea celular HEK293T.TRIP[3D] (figura 29iiiA). La expresión de GFP durante la amplificación de Adeno-CMV-GFP era similar (es decir, no reprimida) en cualquiera de las líneas celulares, tal como se esperaba.

30 Las reservas de vector de Adeno-CMV-GFP y Adeno-CMV-tbsGFP producidas en presencia de TRAP se recolectaron de las células 48 horas después de la inoculación, se eliminaron los residuos y se titularon en células HeLa (figura 29iiiB). Los títulos de vector producidos en células HEK293T o HEK293T.TRIP[3D] eran equivalentes, indicando que la modificación de tbs y la coexpresión de TRAP no bloquean intrínsecamente la biología del vector adenovírico. Por lo tanto, el presente trabajo demuestra que la represión potente de la expresión del transgén en vector adenovirus utilizando el sistema TRIPAdeno resulta posible y que si la actividad del producto del transgén resulta perjudicial para el título o potencia de las partículas de vector adenovirus, esta actividad se verá muy disminuida.

35 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Oxford BioMedica (UK) Limited

<120> Sistema de producción

<130> P102675PCT

ES 2 748 377 T3

<150> GB 1322798.8
 <151> 2013-12-20

<160> 43

<170> PatentIn versión 3.5

5 <210> 1
 <211> 75
 <212> PRT
 <213> Bacillus subtilis

<400> 1
 Met Asn Gln Lys His Ser Ser Asp Phe Val Val Ile Lys Ala Val Glu
 1 5 10 15

Asp Gly Val Asn Val Ile Gly Leu Thr Arg Gly Thr Asp Thr Lys Phe
 20 25 30

His His Ser Glu Lys Leu Asp Lys Gly Glu Val Ile Ile Ala Gln Phe
 35 40 45

Thr Glu His Thr Ser Ala Ile Lys Val Arg Gly Glu Ala Leu Ile Gln
 50 55 60

10 Thr Ala Tyr Gly Glu Met Lys Ser Glu Lys Lys
 65 70 75

<210> 2
 <211> 86
 <212> PRT
 <213> Aminomonas paucivorans

15 <400> 2
 Met Lys Glu Gly Glu Glu Ala Lys Thr Ser Val Leu Ser Asp Tyr Val
 1 5 10 15

Val Val Lys Ala Leu Glu Asn Gly Val Thr Val Ile Gly Leu Thr Arg
 20 25 30

Gly Gln Glu Thr Lys Phe Ala His Thr Glu Lys Leu Asp Asp Gly Glu
 35 40 45

Val Trp Ile Ala Gln Phe Thr Glu His Thr Ser Ala Ile Lys Val Arg
 50 55 60

Gly Ala Ser Glu Ile His Thr Lys His Gly Met Leu Phe Ser Gly Arg
 65 70 75 80

Gly Arg Asn Glu Lys Gly
 85

20 <210> 3
 <211> 81
 <212> PRT
 <213> Desulfotomaculum hydrothermale

ES 2 748 377 T3

<400> 3

Met Asn Pro Met Thr Asp Arg Ser Asp Ile Thr Gly Asp Tyr Val Val
1 5 10 15

Val Lys Ala Leu Glu Asn Gly Val Thr Ile Ile Gly Leu Thr Arg Gly
20 25 30

Gly Val Thr Lys Phe His His Thr Glu Lys Leu Asp Lys Gly Glu Ile
35 40 45

Met Ile Ala Gln Phe Thr Glu His Thr Ser Ala Ile Lys Ile Arg Gly
50 55 60

Arg Ala Glu Leu Leu Thr Lys His Gly Lys Ile Arg Thr Glu Val Asp
65 70 75 80

Ser

<210> 4

<211> 74

5 <212> PRT

<213> Bacillus stearothermophilus

<400> 4

Met Tyr Thr Asn Ser Asp Phe Val Val Ile Lys Ala Leu Glu Asp Gly
1 5 10 15

Val Asn Val Ile Gly Leu Thr Arg Gly Ala Asp Thr Arg Phe His His
20 25 30

Ser Glu Lys Leu Asp Lys Gly Glu Val Leu Ile Ala Gln Phe Thr Glu
35 40 45

His Thr Ser Ala Ile Lys Val Arg Gly Lys Ala Tyr Ile Gln Thr Arg
50 55 60

His Gly Val Ile Glu Ser Glu Gly Lys Lys
65 70

<210> 5

<211> 74

<212> PRT

10 <213> Bacillus stearothermophilus

ES 2 748 377 T3

<400> 5

Met Tyr Thr Asn Ser Asp Phe Val Val Ile Lys Ala Leu Glu Asp Gly
1 5 10 15

Val Asn Val Ile Gly Leu Thr Arg Gly Ala Asp Thr Arg Phe His His
20 25 30

Ser Glu Lys Leu Asp Lys Gly Glu Val Leu Ile Ala Gln Phe Thr Glu
35 40 45

His Thr Ser Ala Ile Lys Val Arg Gly Lys Ala Tyr Ile Gln Thr Arg
50 55 60

His Gly Val Ile Glu Asn Glu Gly Lys Lys
65 70

<210> 6

<211> 76

5 <212> PRT

<213> Bacillus halodurans

<400> 6

Met Asn Val Gly Asp Asn Ser Asn Phe Phe Val Ile Lys Ala Lys Glu
1 5 10 15

Asn Gly Val Asn Val Phe Gly Met Thr Arg Gly Thr Asp Thr Arg Phe
20 25 30

His His Ser Glu Lys Leu Asp Lys Gly Glu Val Met Ile Ala Gln Phe
35 40 45

Thr Glu His Thr Ser Ala Val Lys Ile Arg Gly Lys Ala Ile Ile Gln
50 55 60

Thr Ser Tyr Gly Thr Leu Asp Thr Glu Lys Asp Glu
65 70 75

<210> 7

10 <211> 80

<212> PRT

<213> Carboxydotherrnus hydrogenoformans

<400> 7

Met Val Cys Asp Asn Phe Ala Phe Ser Ser Ala Ile Asn Ala Glu Tyr
1 5 10 15

Ile Val Val Lys Ala Leu Glu Asn Gly Val Thr Ile Met Gly Leu Thr
20 25 30

Arg Gly Lys Asp Thr Lys Phe His His Thr Glu Lys Leu Asp Lys Gly
35 40 45

Glu Val Met Val Ala Gln Phe Thr Glu His Thr Ser Ala Ile Lys Ile
50 55 60

Arg Gly Lys Ala Glu Ile Tyr Thr Lys His Gly Val Ile Lys Asn Glu
65 70 75 80

ES 2 748 377 T3

	<210> 8		
	<211> 55		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
5	<220>		
	<223> Sitio de unión a TRAP		
	<400> 8		
	gaguuuagcg gaguggagaa gagcggagcc gagccuagca gagacgagug gagcu	55	
10	<210> 9		
	<211> 55		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Sitio de unión a TRAP		
15	<400> 9		
	gaguuuagcg gaguggagaa gagcggagcc gagccuagca gagacgagaa gagcu	55	
	<210> 10		
	<211> 30		
	<212> ADN		
20	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> 6 repeticiones de RAGN>2		
	<400> 10		
	uaguuuaguu uaguuuaguu uaguuuaguu	30	
25	<210> 11		
	<211> 30		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
30	<223> 6 repeticiones de RAGN>2		
	<400> 11		
	uaguuuaguu gaguuuaguu gaguuuaguu	30	
	<210> 12		
	<211> 32		
35	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> 6 repeticiones de RAGN>2		
	<400> 12		
40	gaguuuaguu ugaguugagu uugaguugag uu	32	
	<210> 13		
	<211> 32		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		

<220>
 <223> 6 repeticiones de RAGN>2

<400> 13
 uaguuugagu uuaguugagu uuuaguugag uu 32

5 <210> 14
 <211> 68
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 10 <223> secuencias tbs y kozak

<400> 14
 gagtttagcg gaggggagaa gagcggagcc gaggcctagca gagacgagtg gaggcacagc 60
 caccatgg 68

<210> 15
 <211> 13
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia variante de espaciador

<400> 15
 20 acagccacca tgg 13

<210> 16
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Secuencia variante de espaciador

<400> 16
 cagccacat gg 12

30 <210> 17
 <211> 11
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia variante de espaciador

35 <400> 17
 agccacatg g 11

<210> 18
 <211> 10
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia variante de espaciador

<400> 18
 gccacccatgg 10

<210> 19
 <211> 14
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia variante de espaciador

<400> 19
 10 acacgccacc atgg 14

<210> 20
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Secuencia variante de espaciador

<400> 20
 acacagccac catgg 15

20 <210> 21
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia variante de espaciador

25 <400> 21
 acagccacca tgg 13

<210> 22
 <211> 13
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia variante de espaciador

<400> 22
 acagccacct agg 13

35 <210> 23
 <211> 68
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 40 <223> secuencia tbs

<400> 23
 gaggtttagcg gaggtagagaa gaggcgagcc gaggcctagca gaggacgagtg gaggctacagc 60

caccatgg 68

ES 2 748 377 T3

<210> 24
 <211> 68
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> tbs-x11M

<400> 24
 gagtttagcg gagtggagaa gagcggagcc ggcctagca gagacgagaa gagctacagc 60
 caccatgg 68

10 <210> 25
 <211> 63
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> tbs-x10M

15 <400> 25
 gagtttagcg gagtggagaa gagcggagcc ggcctagca gagacgagaa acagccacca 60
 tgg 63

<210> 26
 <211> 58
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> tbs-x9

<400> 26
 gagtttagcg gagtggagaa gagcggagcc ggcctagca gagacacagc caccatgg 58

25 <210> 27
 <211> 53
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> tbs-x8

30 <400> 27
 gagtttagcg gagtggagaa gagcggagcc ggcctagca acagccacca tgg 53

<210> 28
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> tbs-x7

<400> 28
 gagtttagcg gagtggagaa gagcggagcc gagccacagc caccatgg 48

<210> 29
 <211> 43

ES 2 748 377 T3

	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> tbs-x6		
5	<400> 29		
	gagtttagcg gagtggagaa gagcggagcc acagccacca tgg	43	
	<210> 30		
	<211> 38		
	<212> ADN		
10	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> tbs-x5		
	<400> 30		
	gagtttagcg gagtggagaa gagcgacagc caccatgg	38	
15	<210> 31		
	<211> 33		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
20	<223> tbs-x4		
	<400> 31		
	gagtttagcg gagtggagaa acagccacca tgg	33	
	<210> 32		
	<211> 65		
25	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> variante de tbs H3x11 (10)		
	<400> 32		
	gagatttaga cggagttgga gaaagagacg gagaccgaga cctagacaga gaacgagaaa	60	
30	gagct		65
	<210> 33		
	<211> 62		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
35	<220>		
	<223> variante de tbs N3N2x11 (7)		
	<400> 33		
	gagtttagac ggagttggag aaagagacgg agccgagacc tagacagaga acgagaagag	60	
	ct		62
40	<210> 34		
	<211> 60		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		

ES 2 748 377 T3

- <220>
<223> variante de tbs N3N2x11 (5)
- <400> 34
gagtttagac ggagtgagaa aagagacgga gccgagacct agcagagAAC gagaagagct 60
- 5 <210> 35
<211> 58
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- <220>
10 <223> variante de tbs N3N2x11 (3)
- <400> 35
gagtttagcg gagtgagaa agagacggag ccgagacctA gcagagacga gaagagct 58
- 15 <210> 36
<211> 56
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- <220>
<223> variante de tbs N3N2x11 (1)
- 20 <400> 36
gagtttagcg gagtgagaa gagacggagc cgacctagc agagacgaga agagct 56
- <210> 37
<211> 55
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 25 <220>
<223> variante de tbs N2x11 (0)
- <400> 37
gagtttagcg gagtgagaa gagcggagcc gagcctagca gagacgagaa gagct 55
- 30 <210> 38
<211> 55
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- <220>
<223> variante de tbs N2x11 (0)
- 35 <400> 38
gagtttagcg gagtgagaa gagcggagcc gagcctagca gagacgagaa gagct 55
- <210> 39
<211> 41
<212> ADN
40 <213> Secuencia artificial
- <220>
<223> variante de tbs N3N2x8 (1)
- <400> 39
gagtttagcg gagtgagaa agacggagc cgacctagc a 41

<210> 40
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> variante de tbs N3N2x7 (1)

<400> 40
 gagtttagcg gagtggagaa agagcggagc cgagcc 36

10 <210> 41
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> variante de tbs N2x7 (0)

15 <400> 41
 gagtttagcg gagtggagaa gagcggagcc gagcc 35

<210> 42
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> variante de tbs N2x6 (0) tbs

<400> 42
 gagtttagcg gagtggagaa gagcggagcc 30

25 <210> 43
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> variante de tbs N2x5 (0)

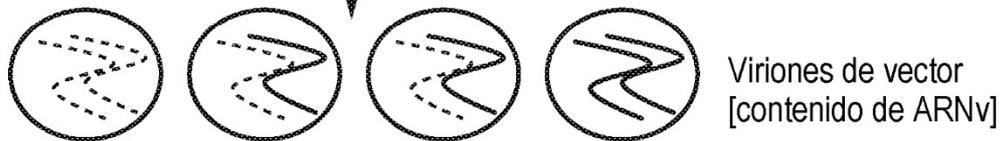
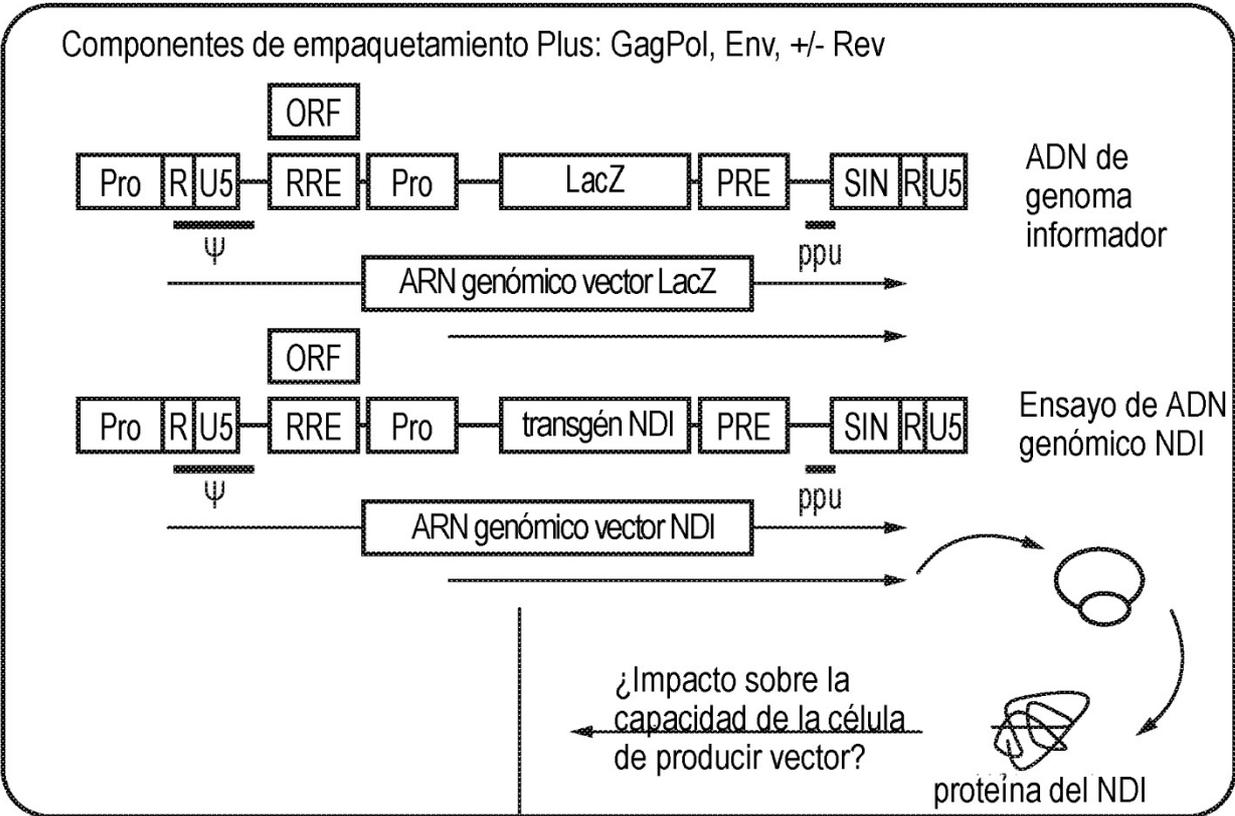
30 <400> 43
 gagtttagcg gagtggagaa gagcg 25

REIVINDICACIONES

1. Vector vírico que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que comprende un sitio de unión operablemente ligado a un nucleótido de interés, en el que el sitio de unión es capaz de interactuar con una proteína de unión a ARN, de manera que la traducción del nucleótido de interés resulta reprimida en una célula de producción del vector vírico, y en el que la proteína de unión a ARN es la proteína de atenuación de la unión a ARN del triptófano (TRAP).
5
2. Vector vírico según la reivindicación 1, en el que el sitio de unión de TRAP comprende múltiples repeticiones de la secuencia RAGN₂₋₃ y en el que R es T o U o G.
10
3. Vector vírico según la reivindicación 1 o 2, en el que el sitio de unión de TRAP comprende por lo menos 8 repeticiones de la secuencia RAGN₂₋₃ y en el que R es T o U o G y en el que además el número de repeticiones de RAGNNN es 1 o menos.
15
4. Vector vírico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el sitio de unión de TRAP comprende 8 a 11 repeticiones de la secuencia RAGN₂ y en el que R es T o U o G.
20
5. Vector vírico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el sitio de unión de TRAP comprende 11 repeticiones de la secuencia RAGN₂₋₃, en el que el número de repeticiones de RAGNNN es 3 o menos y en el que R es T o U o G.
25
6. Vector vírico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el nucleótido de interés produce un efecto terapéutico.
30
7. Vector vírico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que se deriva de un retrovirus, adenovirus, virus adenoasociado, virus herpes simplex, virus Vaccinia o baculovirus.
35
8. Vector vírico según la reivindicación 7 que se deriva de un lentivirus.
40
9. Vector vírico según la reivindicación 8 que se deriva de VIH-1, VIH-2, VIS, VIF, VIB, VAIE, VAEC o lentivirus Visna.
45
10. Sistema de producción de vector vírico que comprende un conjunto de secuencias de ácidos nucleicos codificantes de los componentes requeridos para la producción del vector vírico, en el que el genoma del vector comprende la secuencia de ácidos nucleicos tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
50
11. Sistema de producción de vector vírico según la reivindicación 10, en el que el vector vírico es un vector retrovírico y el sistema de producción de vectores víricos comprende además secuencias de ácidos nucleicos codificantes de las proteínas Gag y Pol, la proteína de unión a ARN y la proteína Env, o sustitutos funcionales de los mismos.
55
12. Sistema de producción de vector vírico según la reivindicación 10 o 11, en el que el vector vírico se deriva de un lentivirus.
60
13. Célula de producción de vector vírico que comprende la secuencia de ácidos nucleicos tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o el sistema de producción de vectores víricos según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12.
65
14. Célula de producción de vector vírico según la reivindicación 13, en la que la célula se transfecta transitoriamente con un vector codificante de una proteína de unión a ARN capaz de interactuar con un sitio de unión según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
70
15. Célula de producción de vector vírico según la reivindicación 14, en la que la célula expresa establemente una proteína de unión a ARN capaz de interactuar con un sitio de unión según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
75
16. Procedimiento para producir vectores víricos, que comprende introducir la secuencia de ácidos nucleicos tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o el sistema de producción de vectores víricos según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12 en una célula de producción de vector vírico y cultivar la célula de producción bajo condiciones adecuadas para la producción de los vectores víricos.
80
17. Célula transducida por el vector vírico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
85

- 5 18. Método para identificar los sitios de unión a ácidos nucleicos y las proteínas de unión a ácidos nucleicos que son capaces de interactuar de manera que la traducción de un nucleótido de interés resulta reprimida en la célula de producción de vector vírico al ligarse operablemente con el sitio de unión a ácido nucleico tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el método comprende analizar la expresión de un gen informador en la célula que comprende tanto el sitio de unión a ácido nucleico operablemente ligado al gen informador como la proteína de unión a ácidos nucleicos.
- 10 19. Método para reprimir la traducción de un nucleótido de interés (NDI) en una célula de producción de vector vírico, comprendiendo el método introducir en la célula de producción de vector vírico la secuencia de ácidos nucleicos tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y una secuencia de ácidos nucleicos codificante de una proteína de unión a ARN (PUA), en la que la PUA se une al sitio de unión a PUA, reprimiendo de esta manera la traducción del NDI.
- 15 20. Método para incrementar los títulos de vector vírico en una célula eucariótica de producción de vector, comprendiendo el método introducir en la célula eucariótica de producción de vector el sistema de producción de vectores víricos según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12 y una secuencia de ácidos nucleicos codificante de una proteína de unión a ARN (PUA), en la que la PUA se une al sitio de unión a PUA y reprime la traducción del NDI, incrementando de esta manera los títulos de vector vírico respecto a un vector vírico que no presenta ningún sitio de unión a PUA.
- 20

Vista general del experimento de mezcla de plásmidos de vector retro/lentivirico para someter a ensayo el impacto del transgén NDI sobre los títulos de vector



50% de partículas de vector capaces de transportar vector lacZ hasta células diana

Ensayo de lectura, p.ej. tinción X-gal de células transducidas
 Comparación título de lacZ de la mezcla NDI: vector LacZ frente a la mezcla GFP:vector LacZ para identificar el grado de impacto de la proteína del transgén NDI sobre la capacidad celular de producir vector

FIG. 2

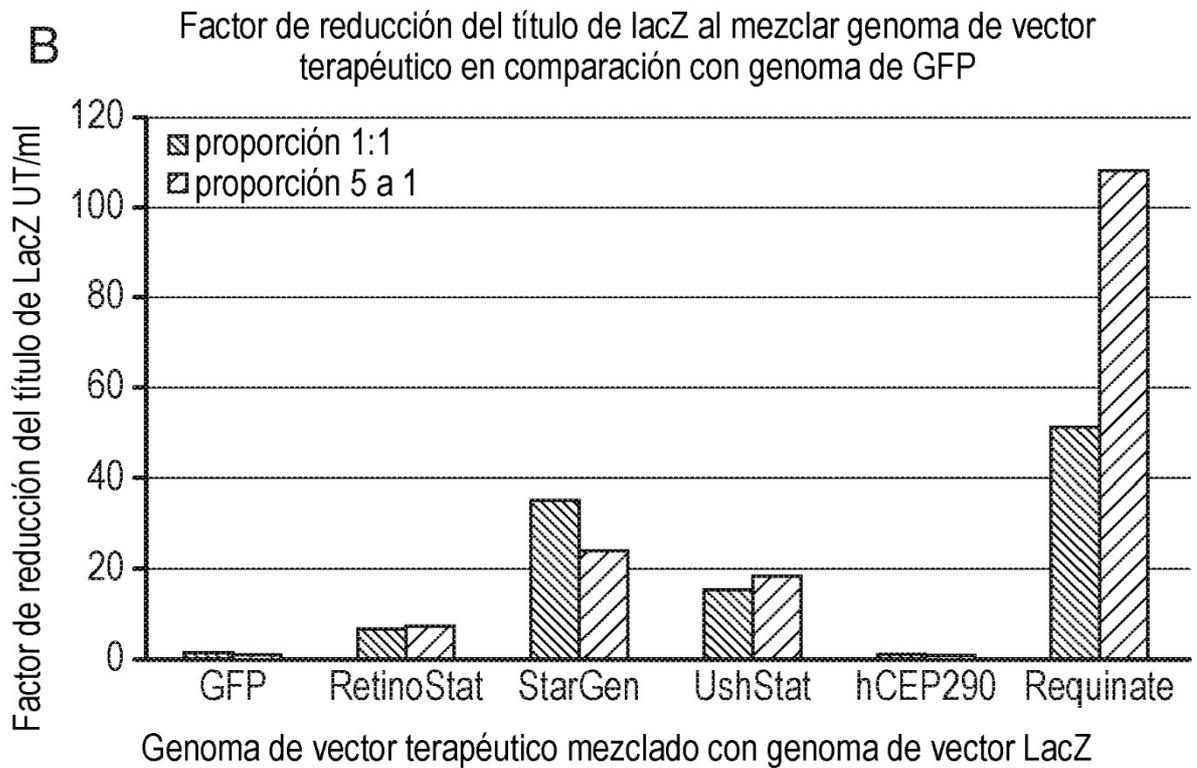
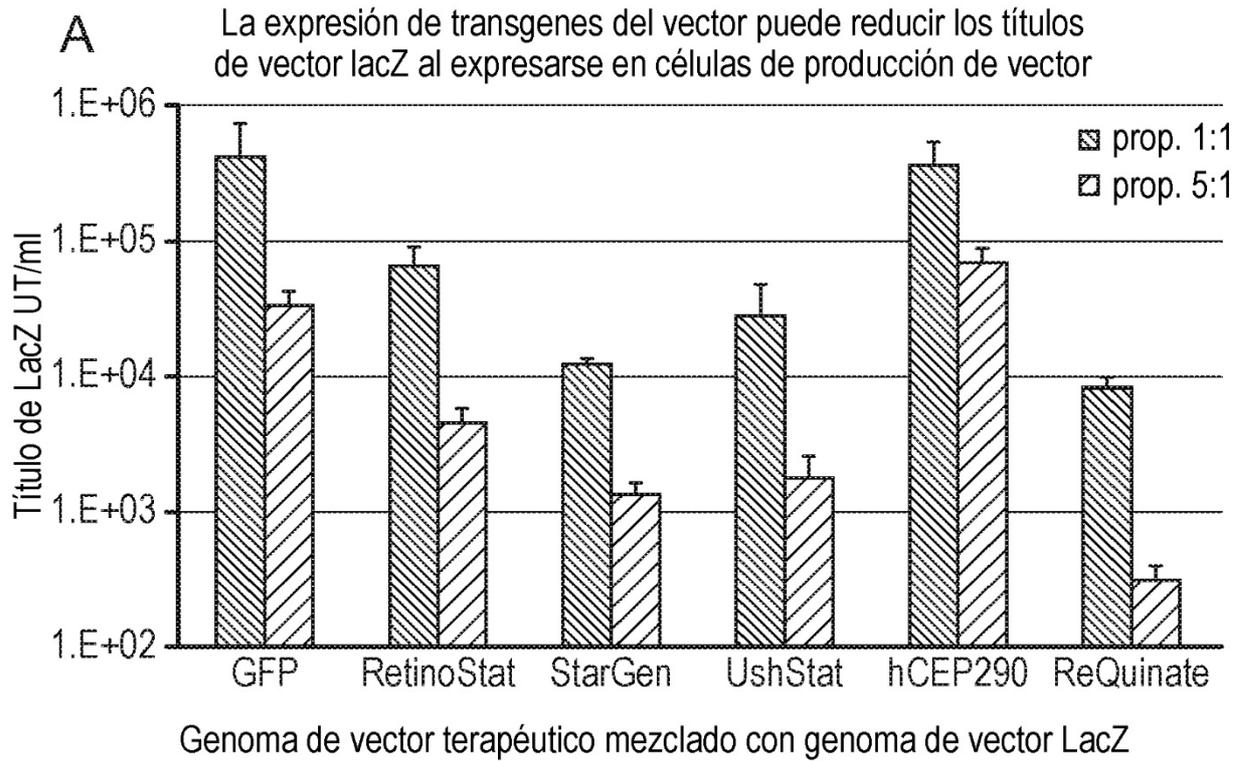


FIG. 3i

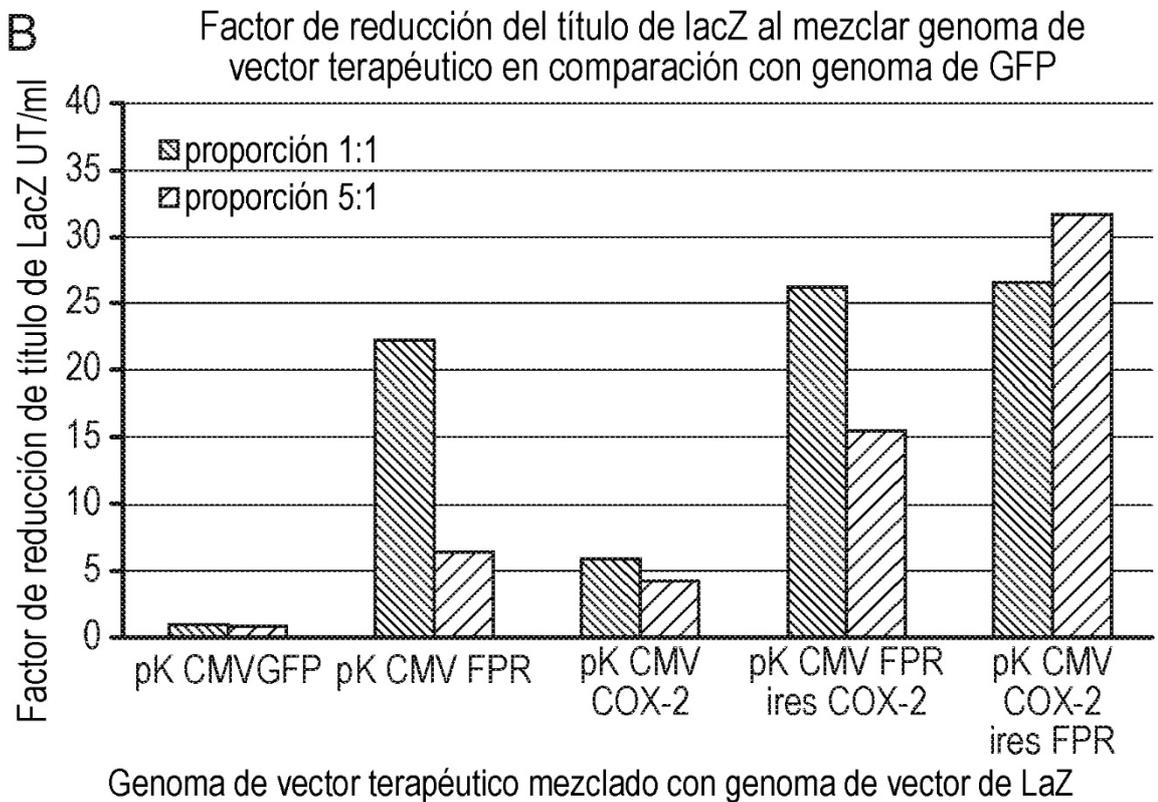
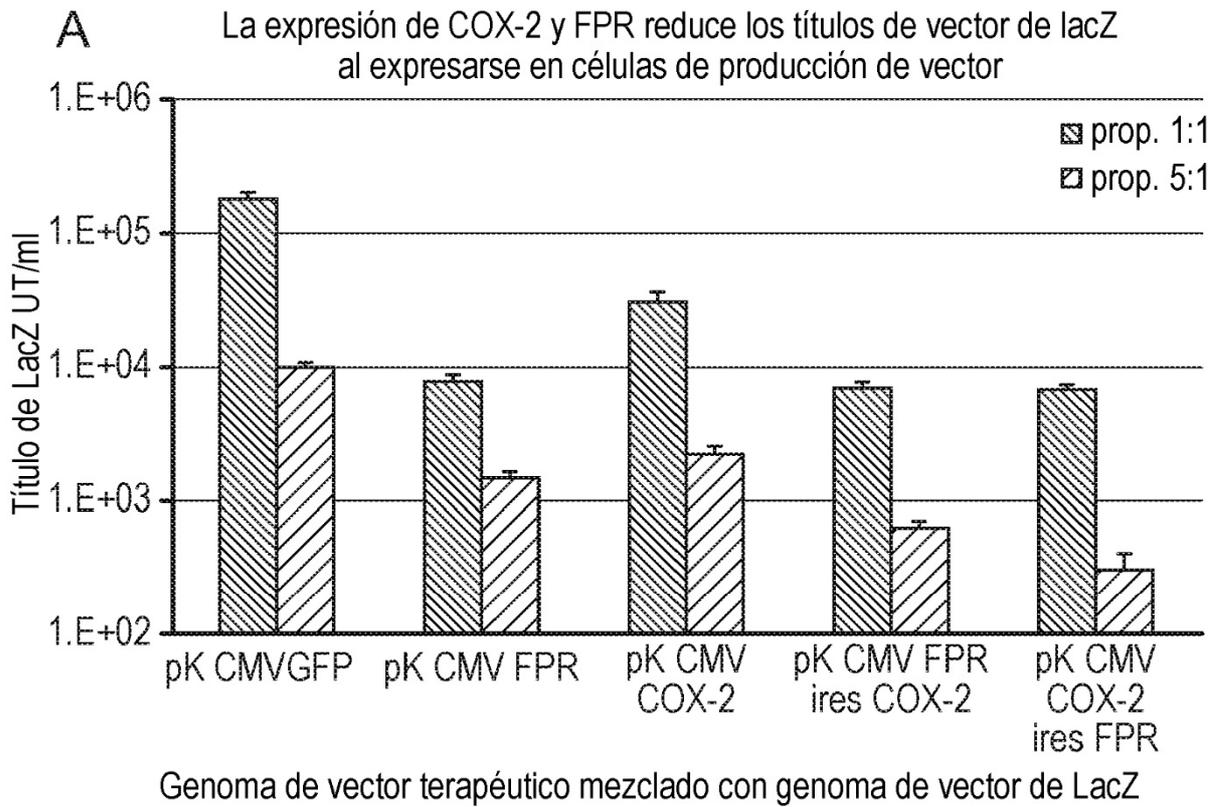


FIG. 3ii

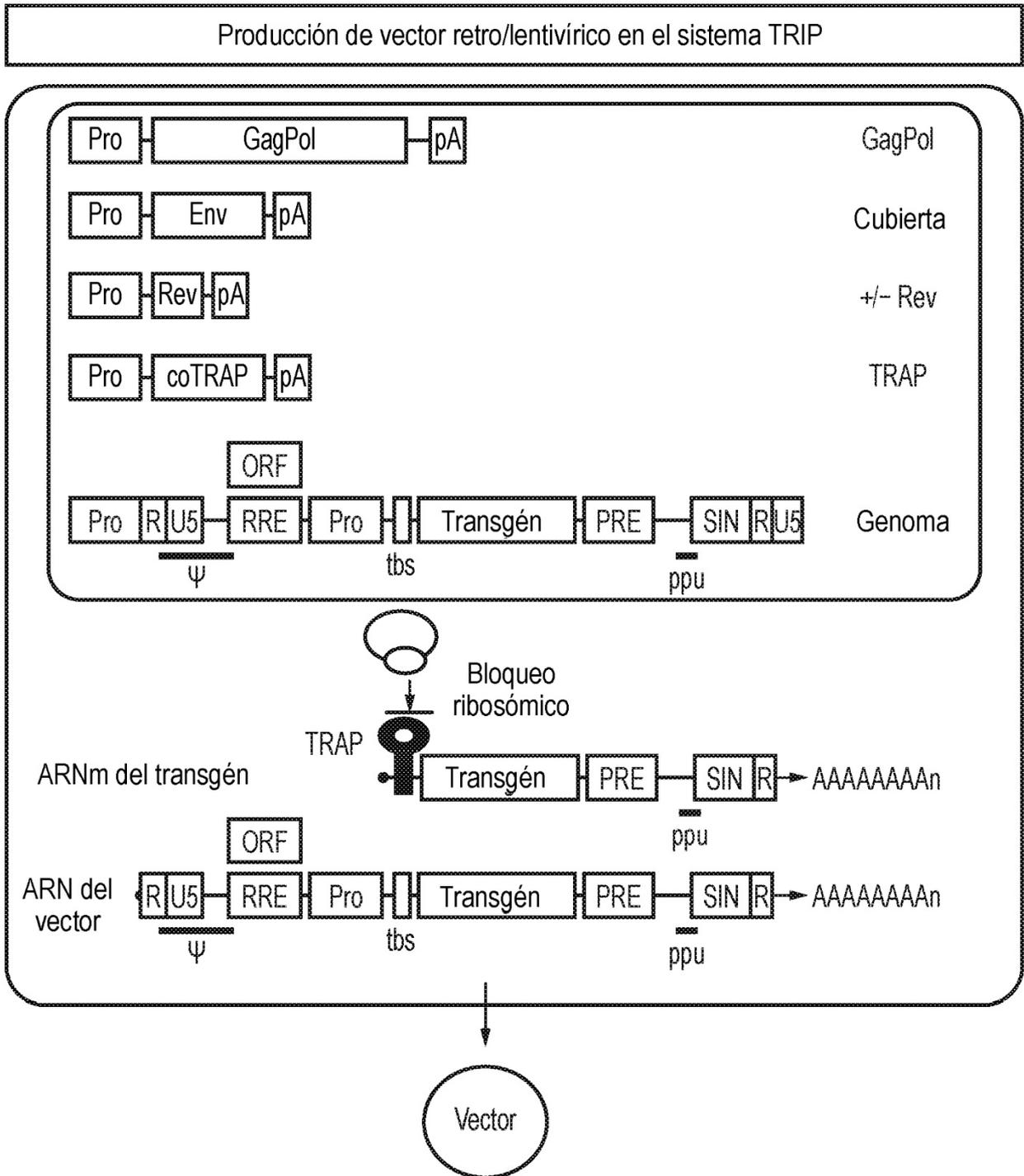
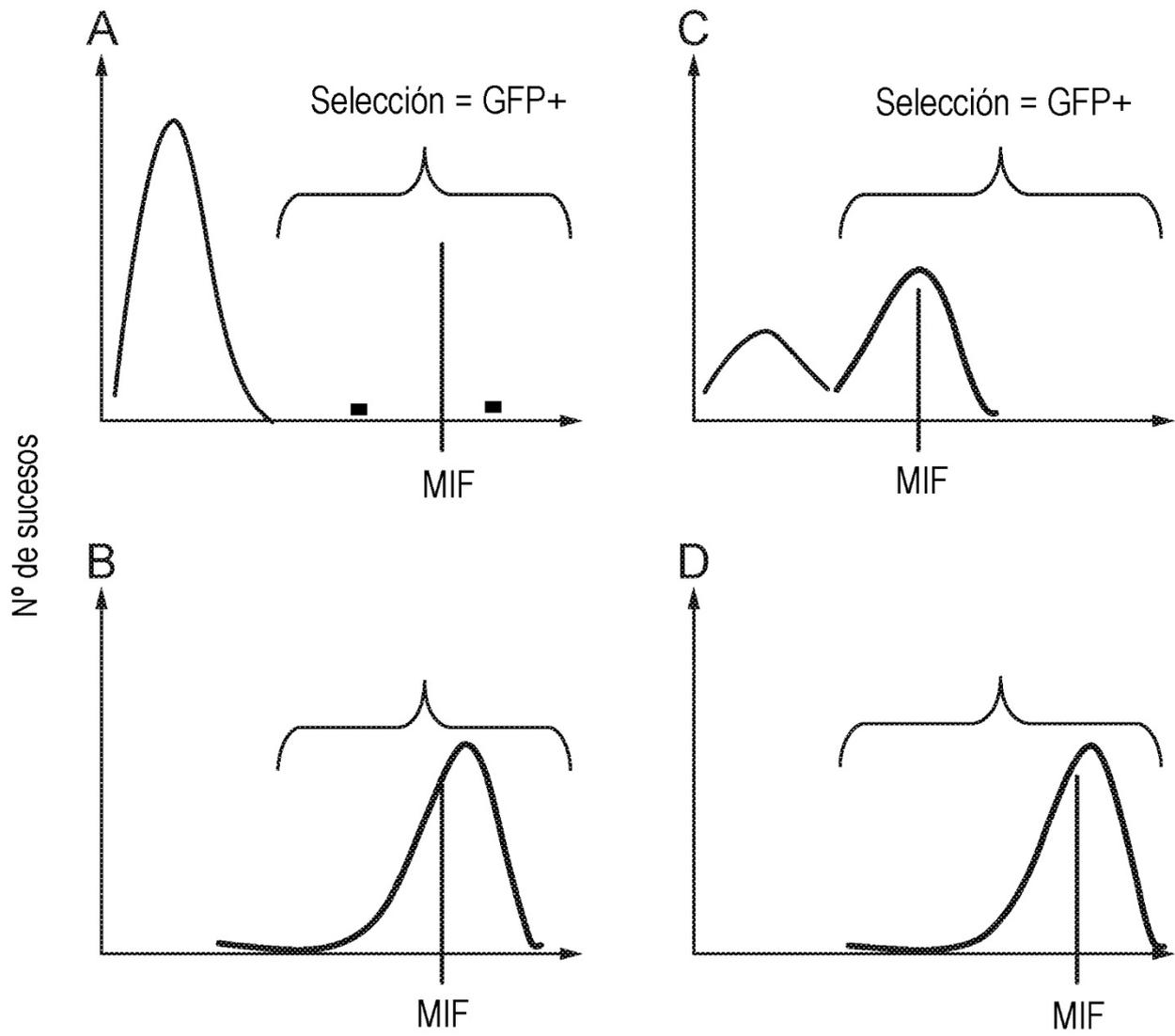


FIG. 4



Log Fluorescencia de GFP

FIG. 5

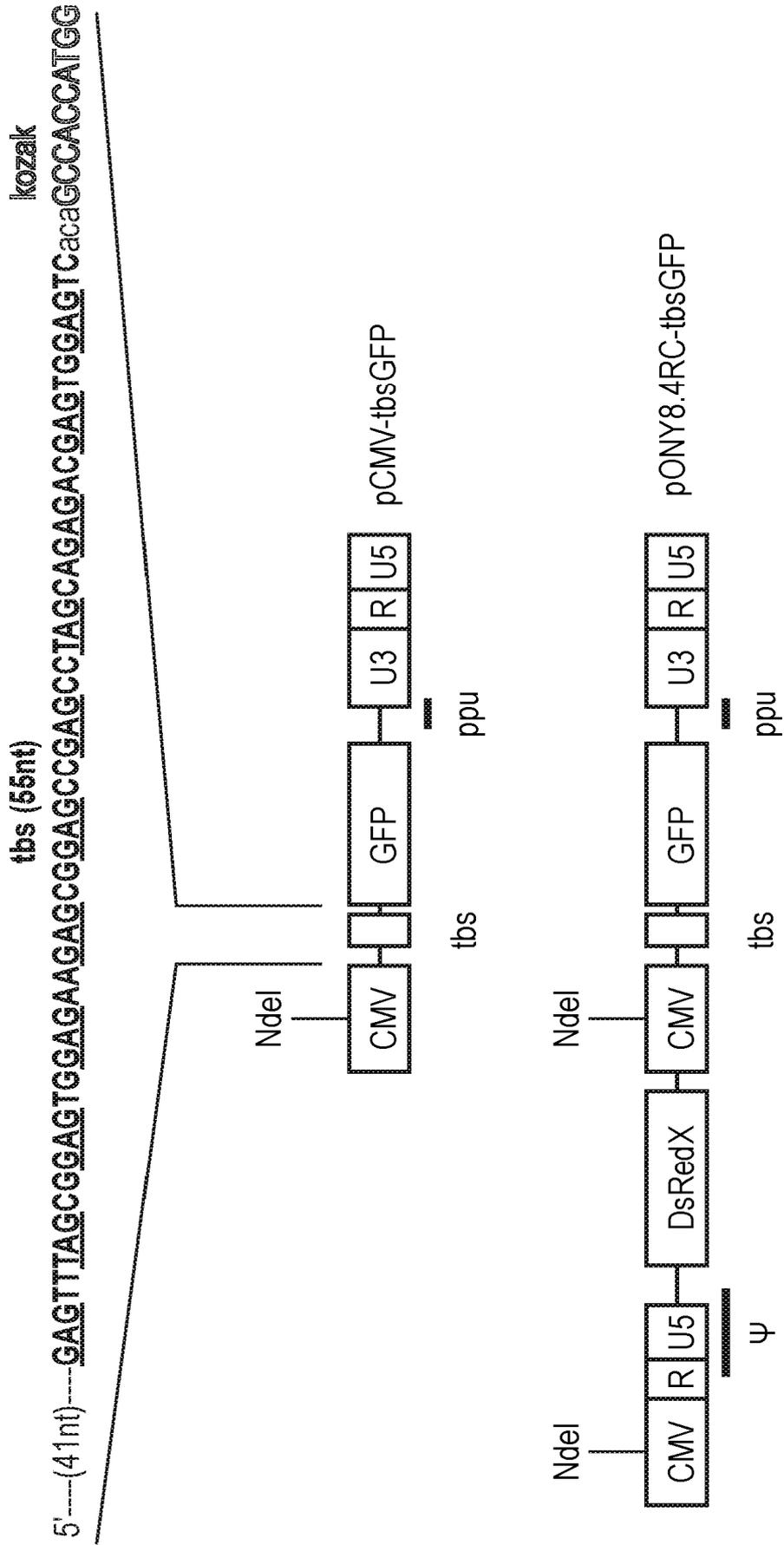


FIG. 6

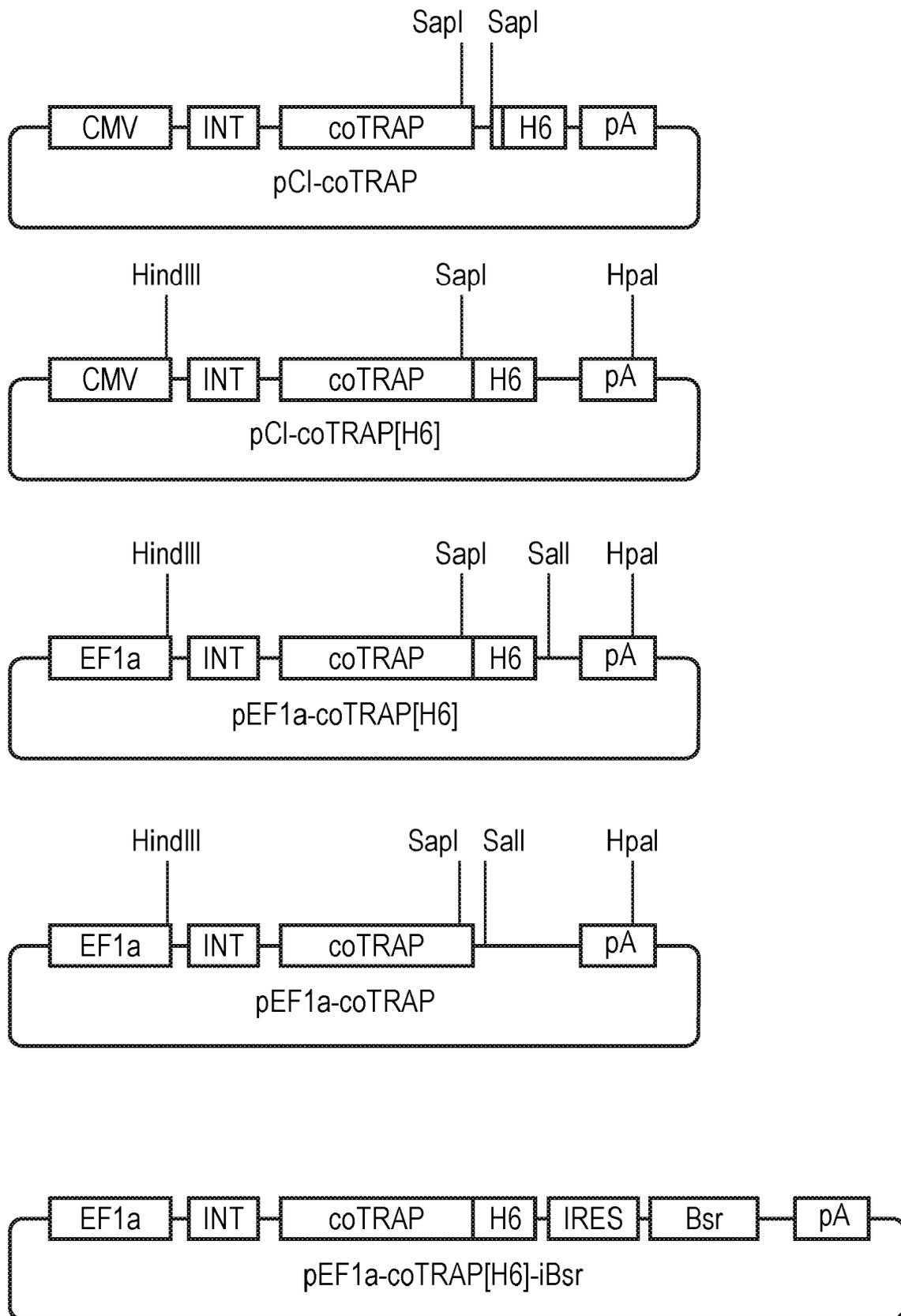


FIG. 7

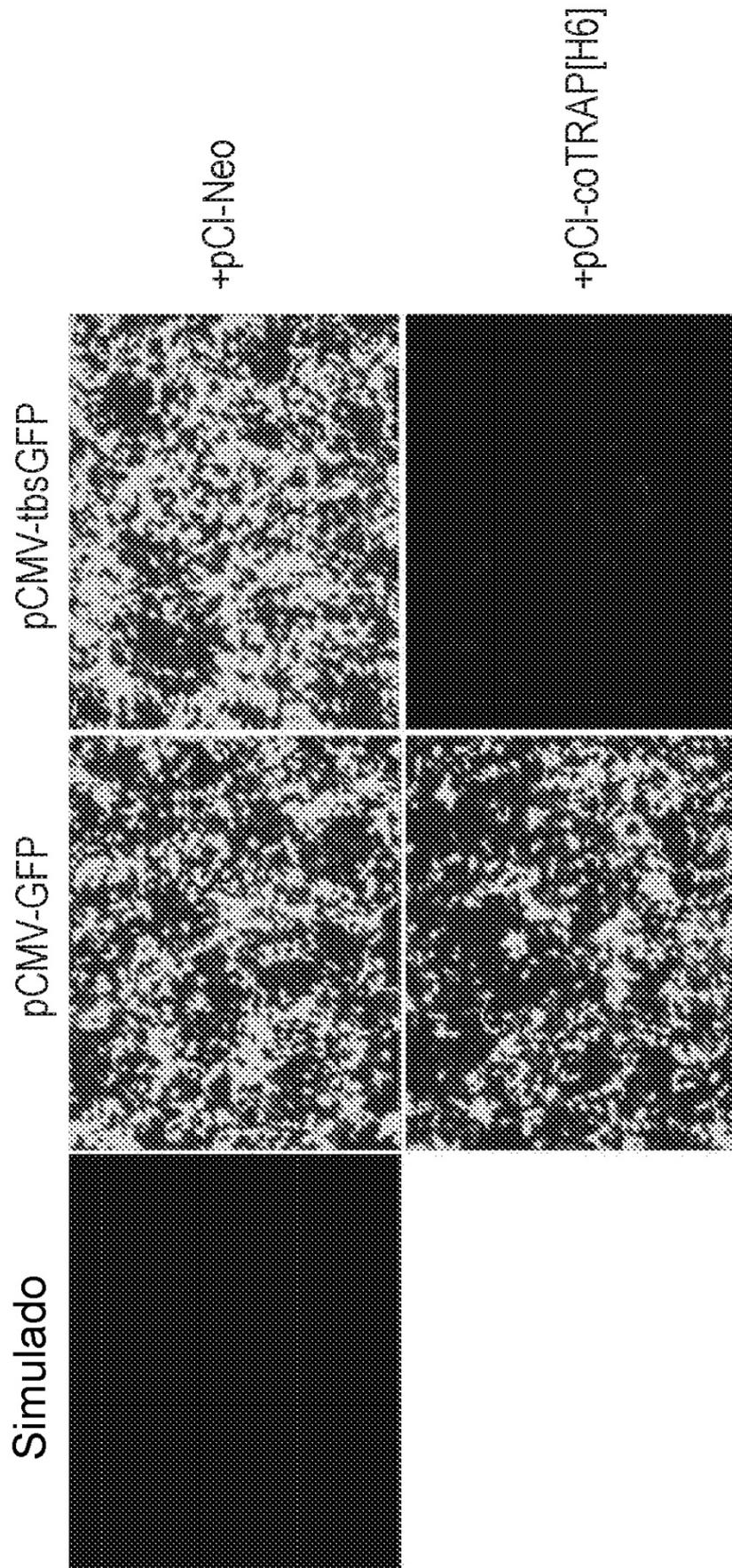


FIG. 8

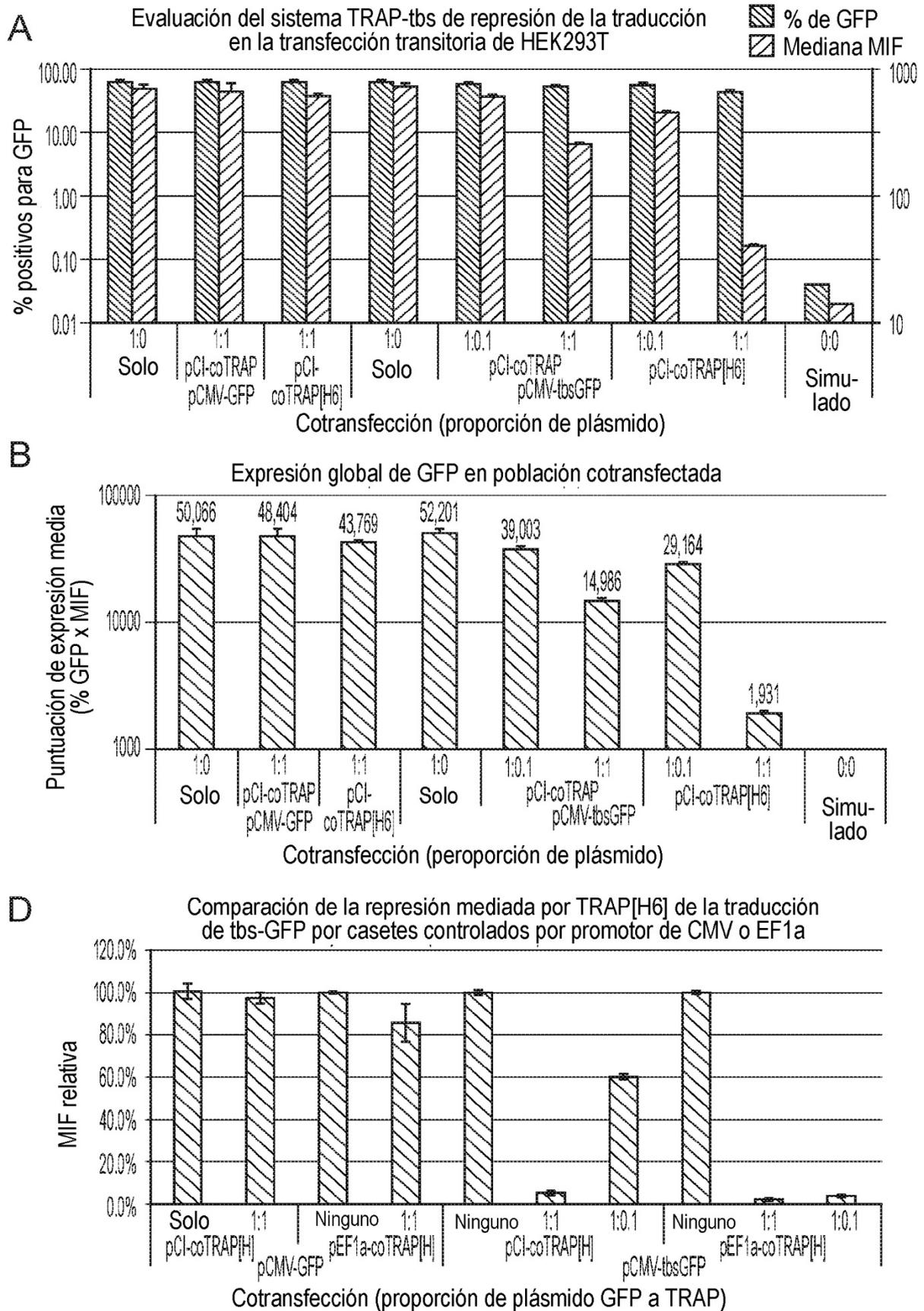


FIG. 9

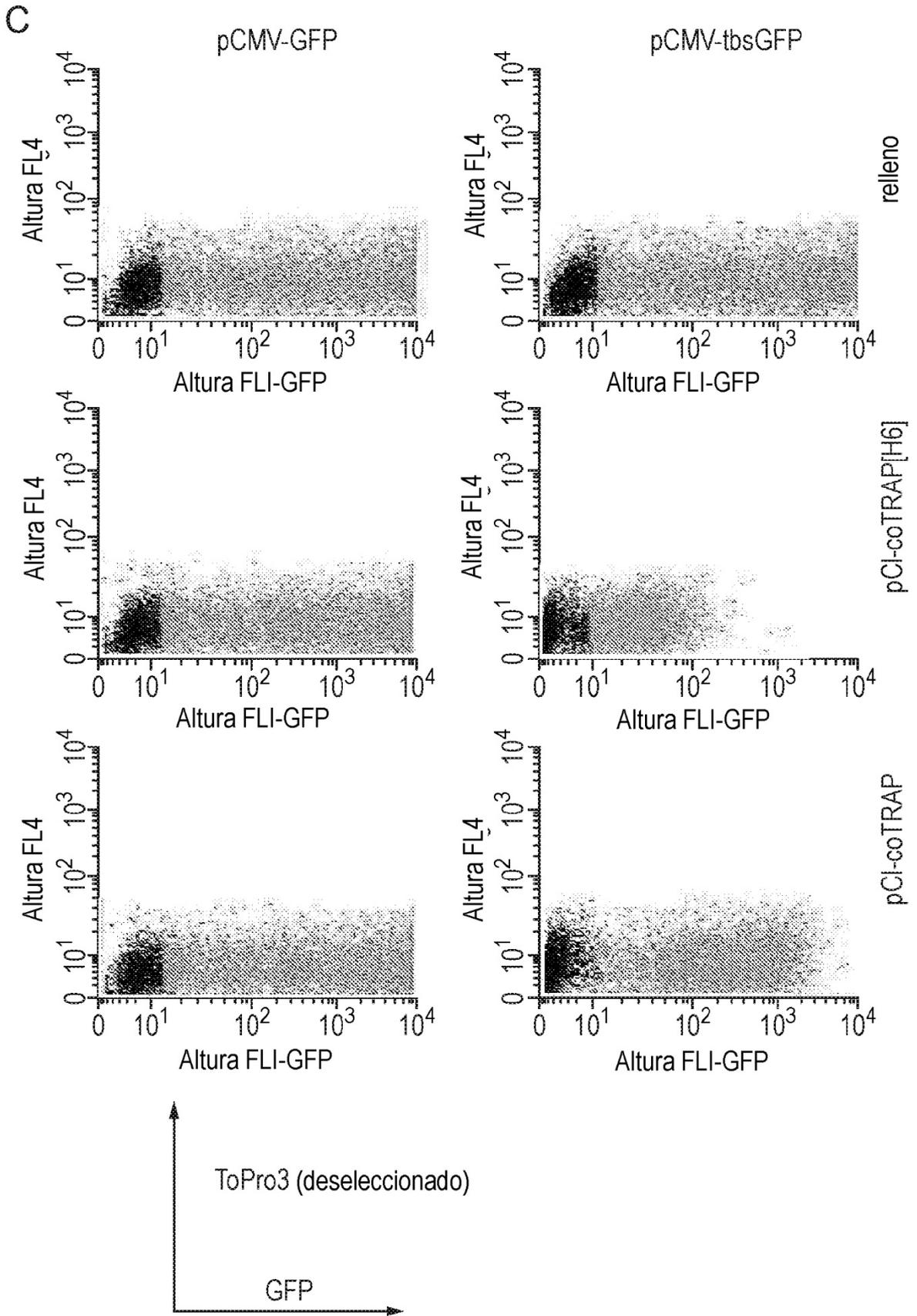


FIG. 9 (continuación)

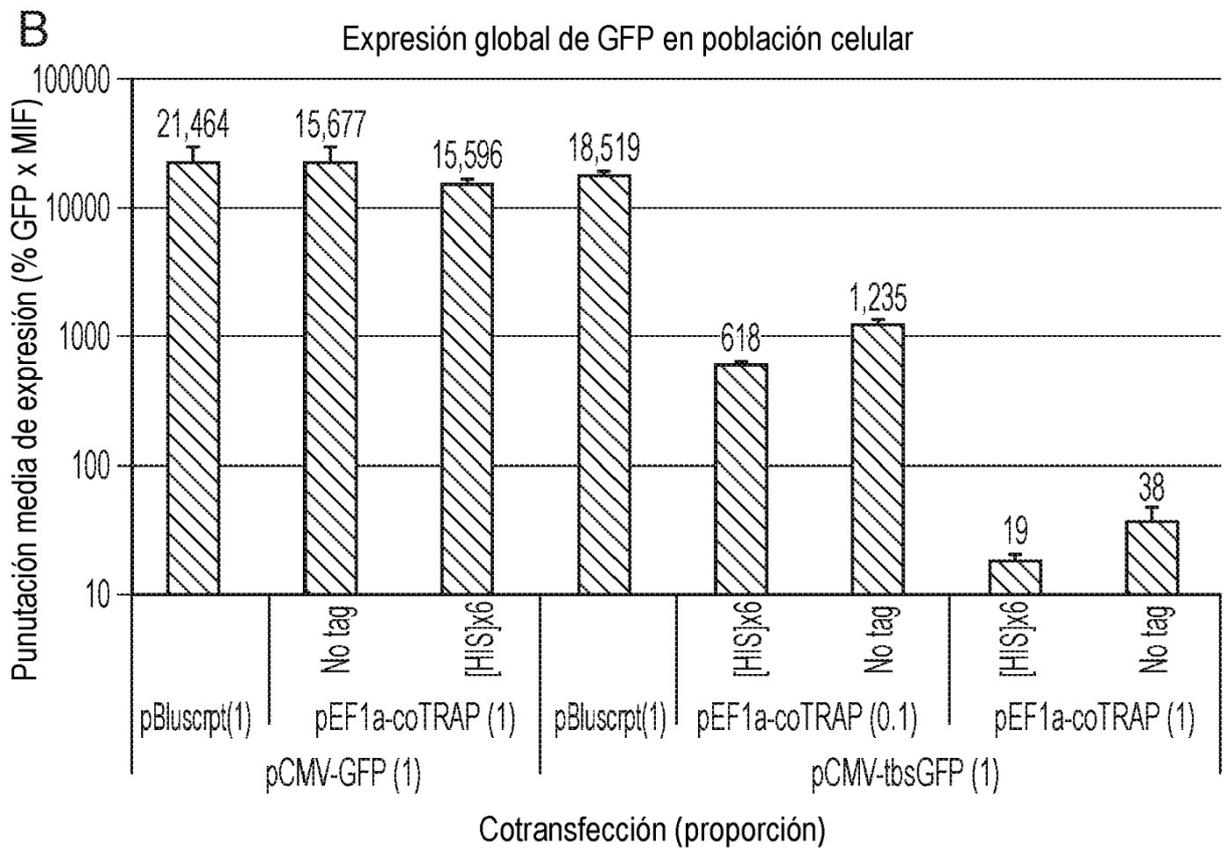
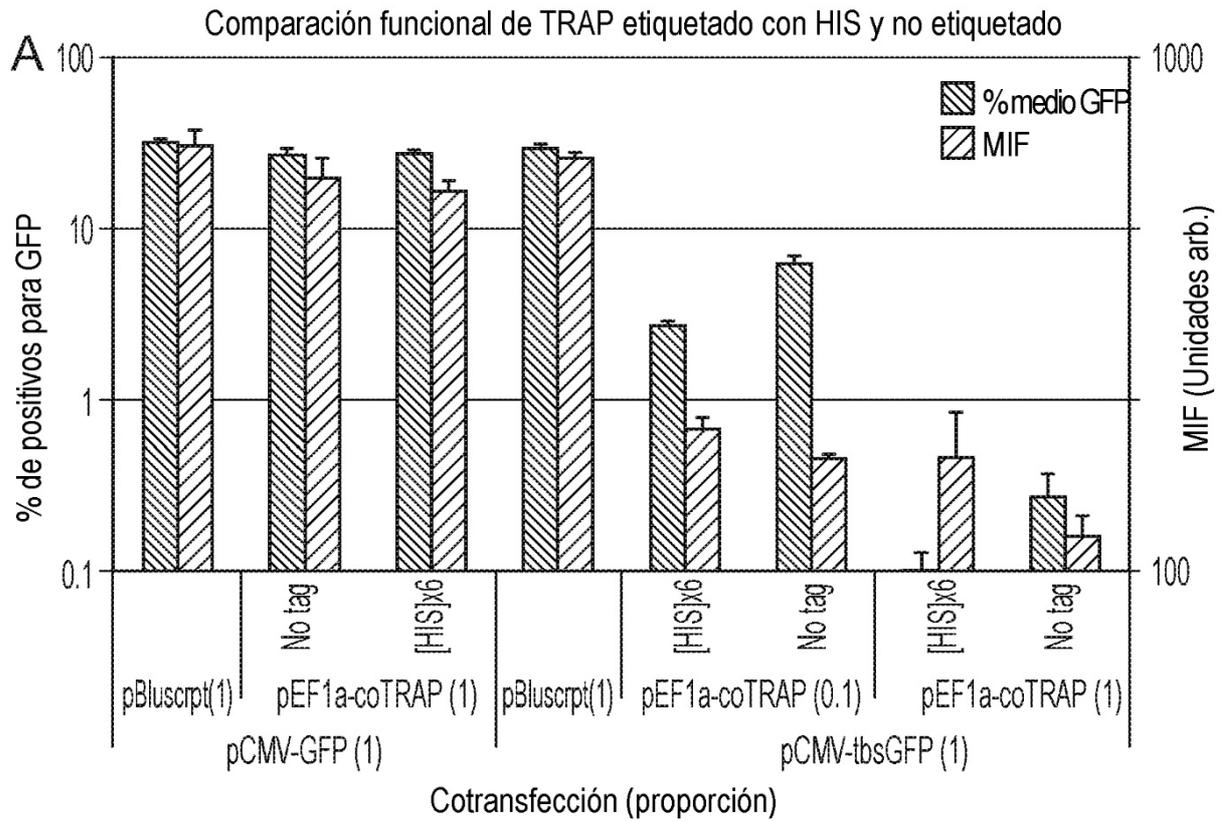


FIG. 10

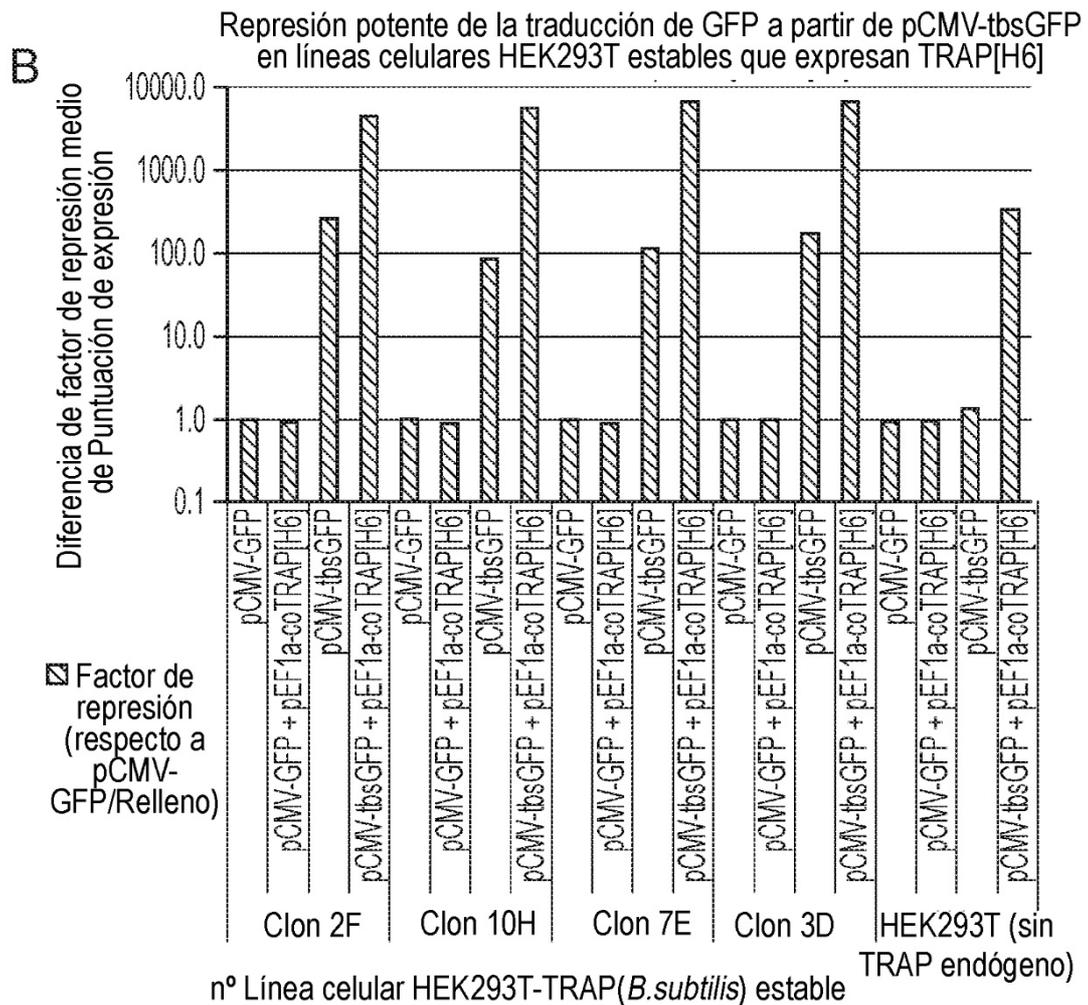
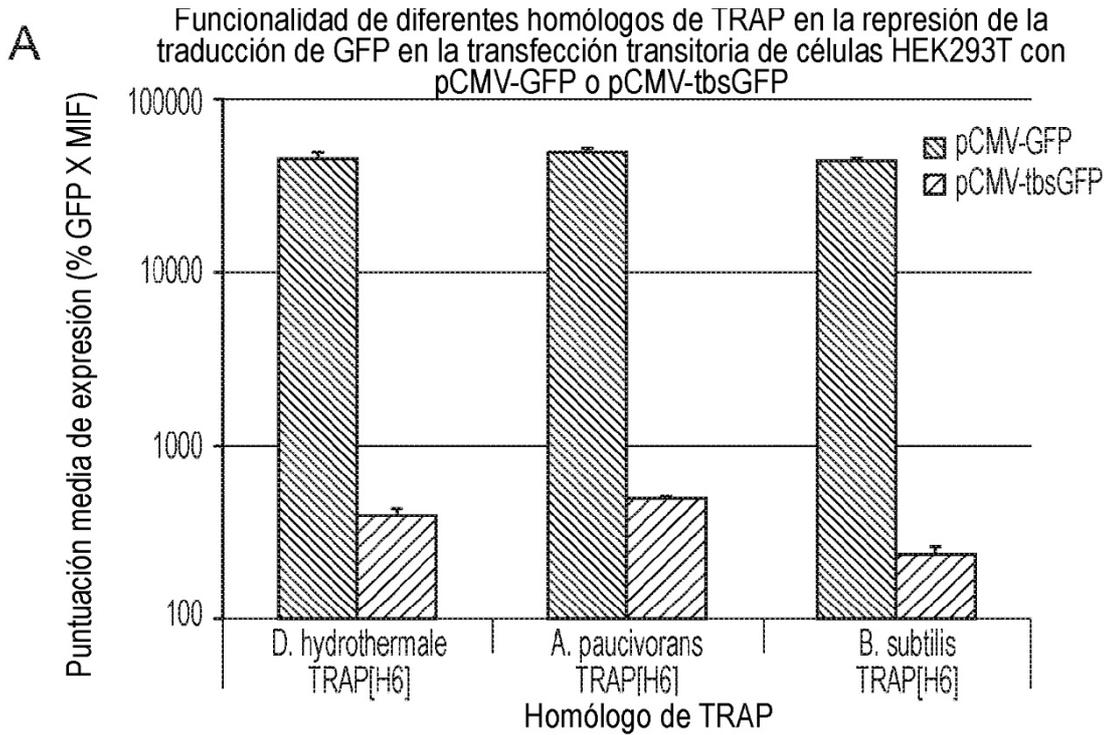


FIG. 11

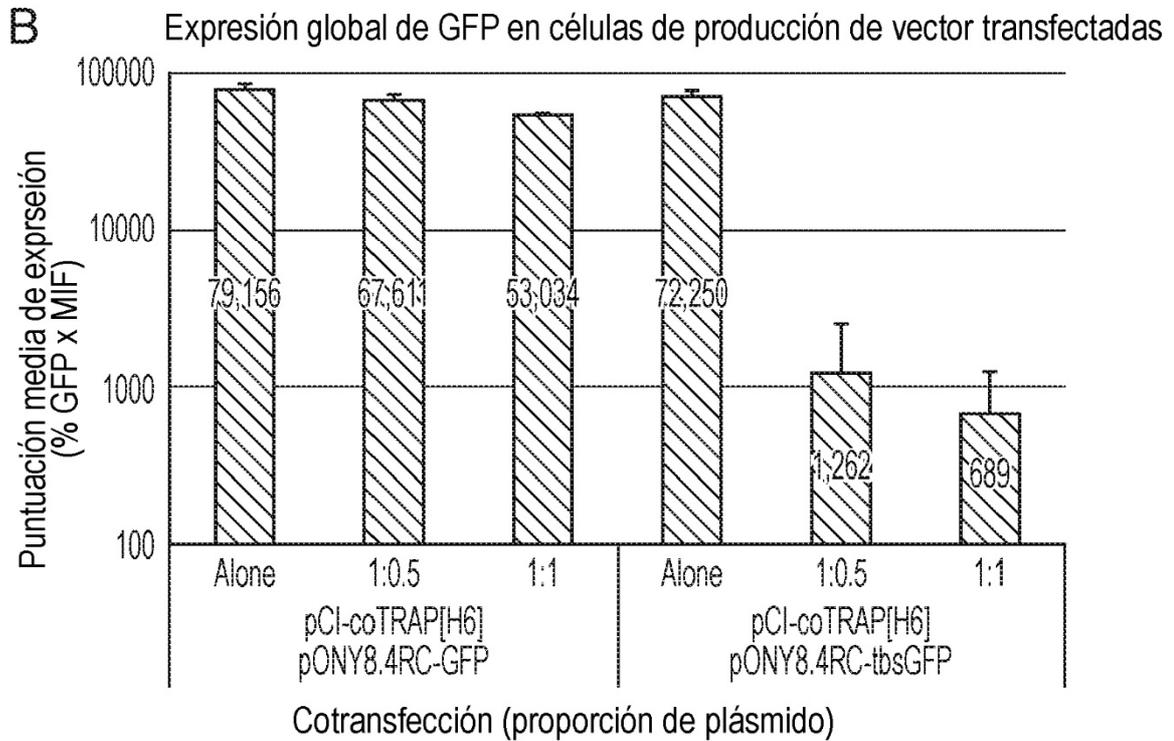
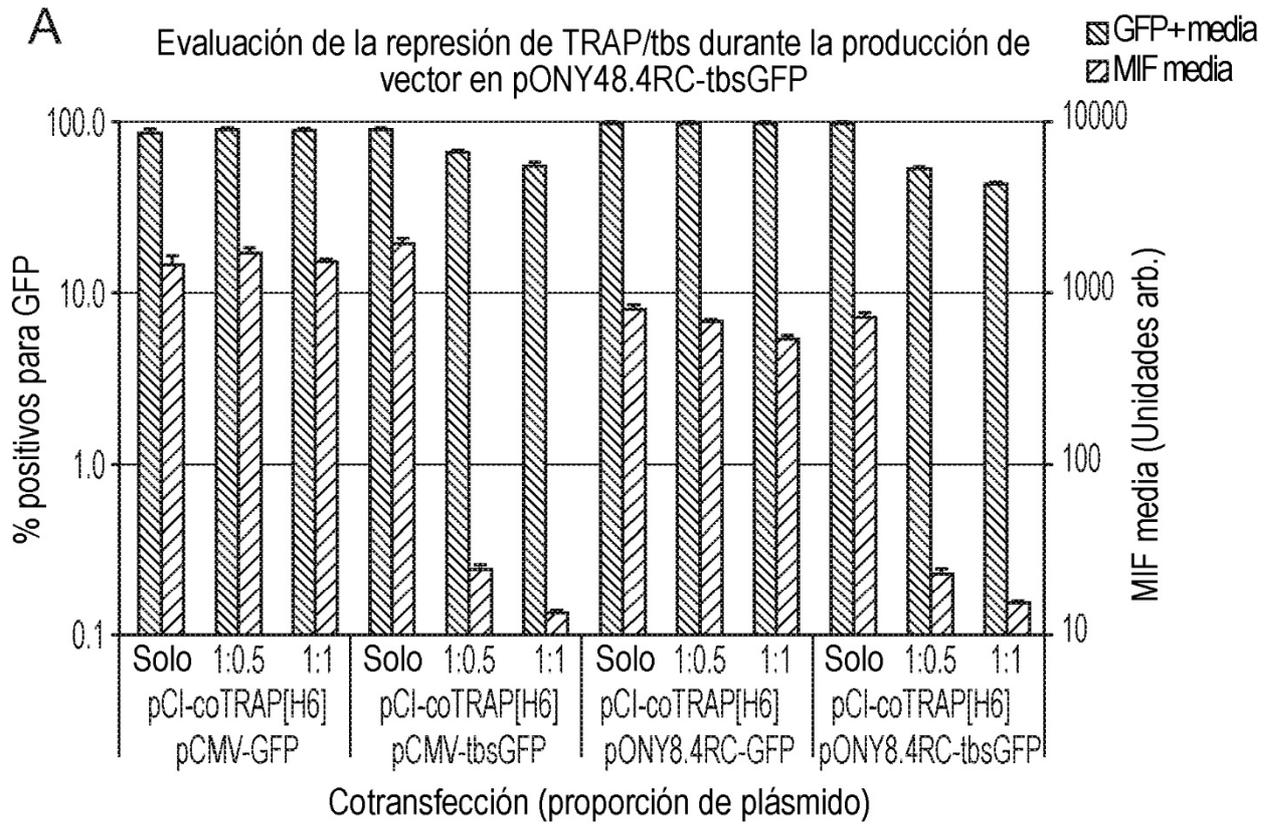


FIG. 12

C Efecto despreciable de coTRAP[H6] o tbs sobre la actividad del vector pONY8.4RC-tbsGFP

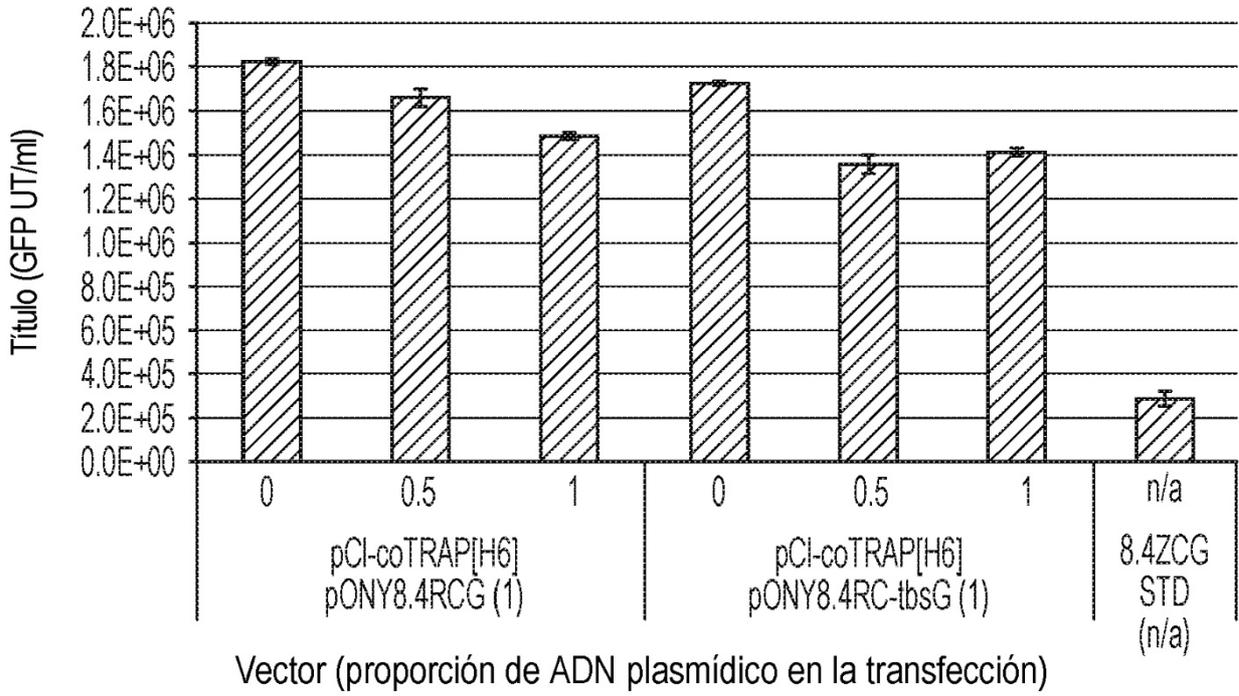
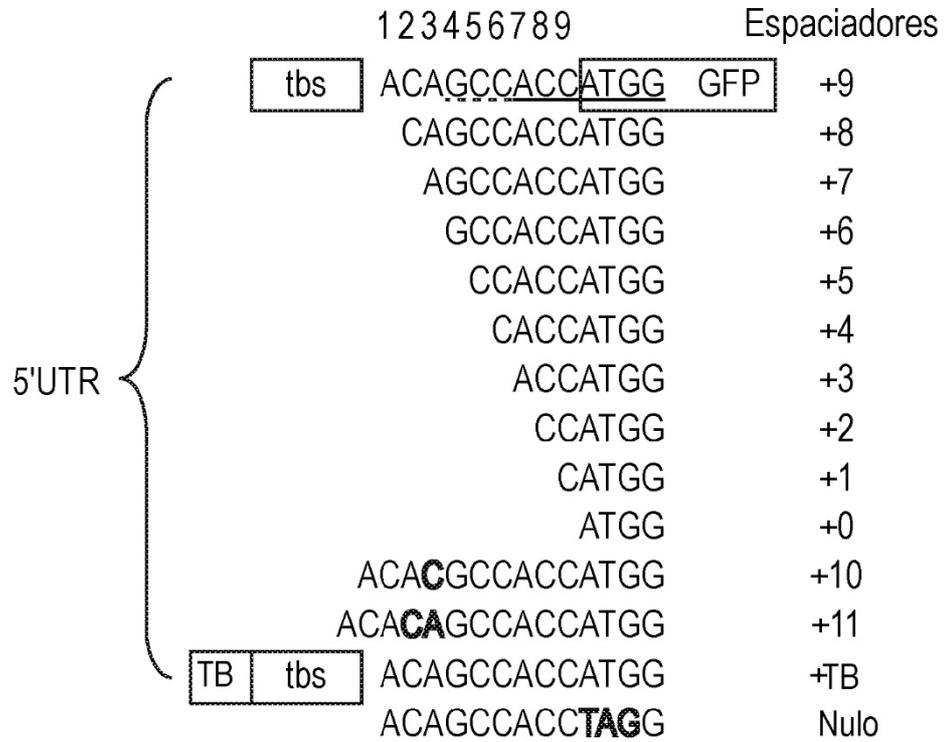


FIG. 12 (continuación)

A Ensayo de los requisitos de espaciado para tbs en relación a AUG



B

Evaluación de las restricciones de espacio entre tbs y AUG en relación a la supresión por TRAP de la traducción

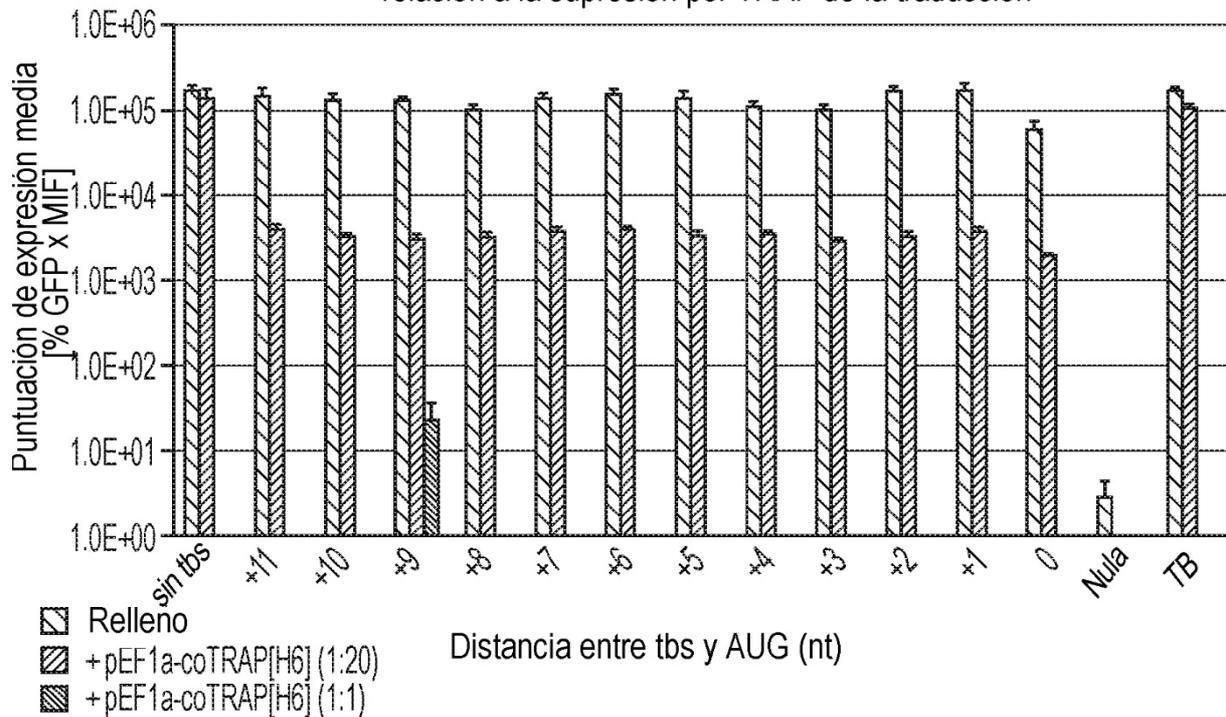


FIG. 13

A

Reducción del número de repeticiones de RAGNN de la secuencia tbs

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Kozak
tbs	<u>GAGTTTAGCGGAGTGGAGAAGAGCGGAGCCGAGCCTAGCAGAGACGAGTGGAGCTACAGCCACCATGG</u>											
tbs-x11M	GAGTTTAGCGGAGTGGAGAAGAGCGGAGCCGAGCCTAGCAGAGACGAGaaGAGCTACAGCCACCATGG											
tbs-X10M	GAGTTTAGCGGAGTGGAGAAGAGCGGAGCCGAGCCTAGCAGAGACGAGaaACAGCCACCATGG											
tbs-x9	GAGTTTAGCGGAGTGGAGAAGAGCGGAGCCGAGCCTAGCAGAGACACAGCCACCATGG											
tbs-x8	GAGTTTAGCGGAGTGGAGAAGAGCGGAGCCGAGCCTAGCAACAGCCACCATGG											
tbs-x7	GAGTTTAGCGGAGTGGAGAAGAGCGGAGCCGAGCCACAGCCACCATGG											
tbs-x6	GAGTTTAGCGGAGTGGAGAAGAGCGGAGCCACAGCCACCATGG											
tbs-x5	GAGTTTAGCGGAGTGGAGAAGAGCGACAGCCACCATGG											
tbs-x4	GAGTTTAGCGGAGTGGAGAAACAGCCACCATGG											

B

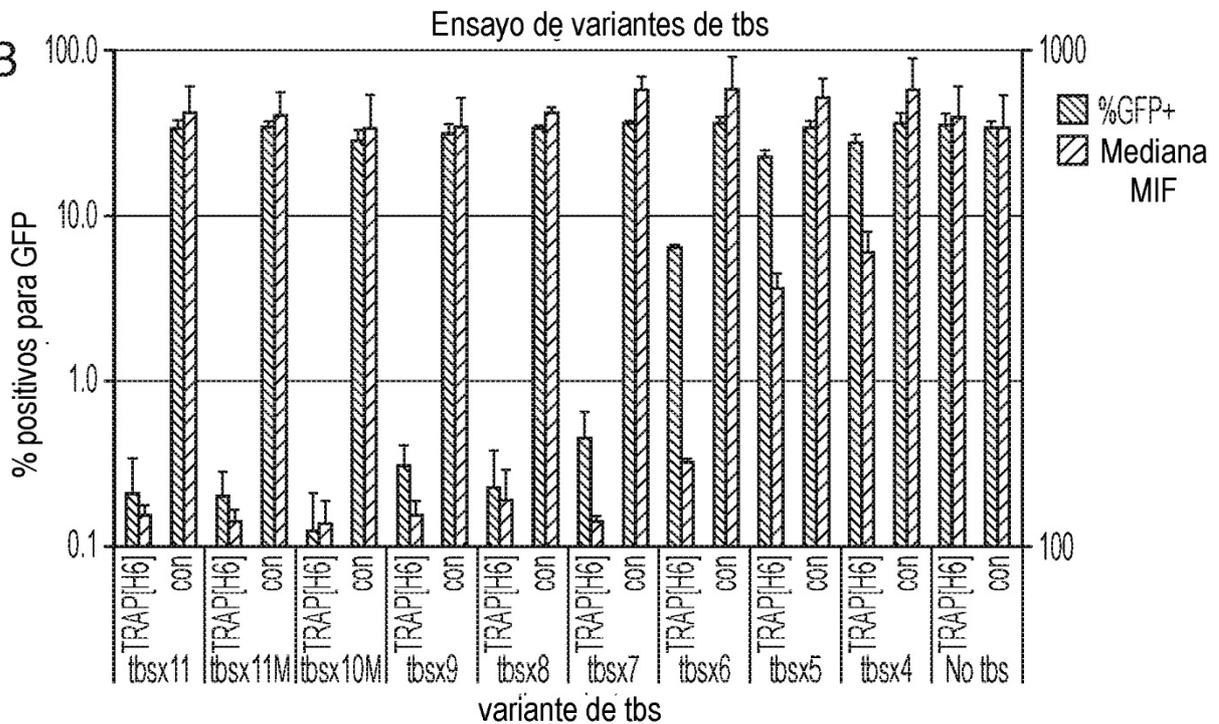


FIG. 14i

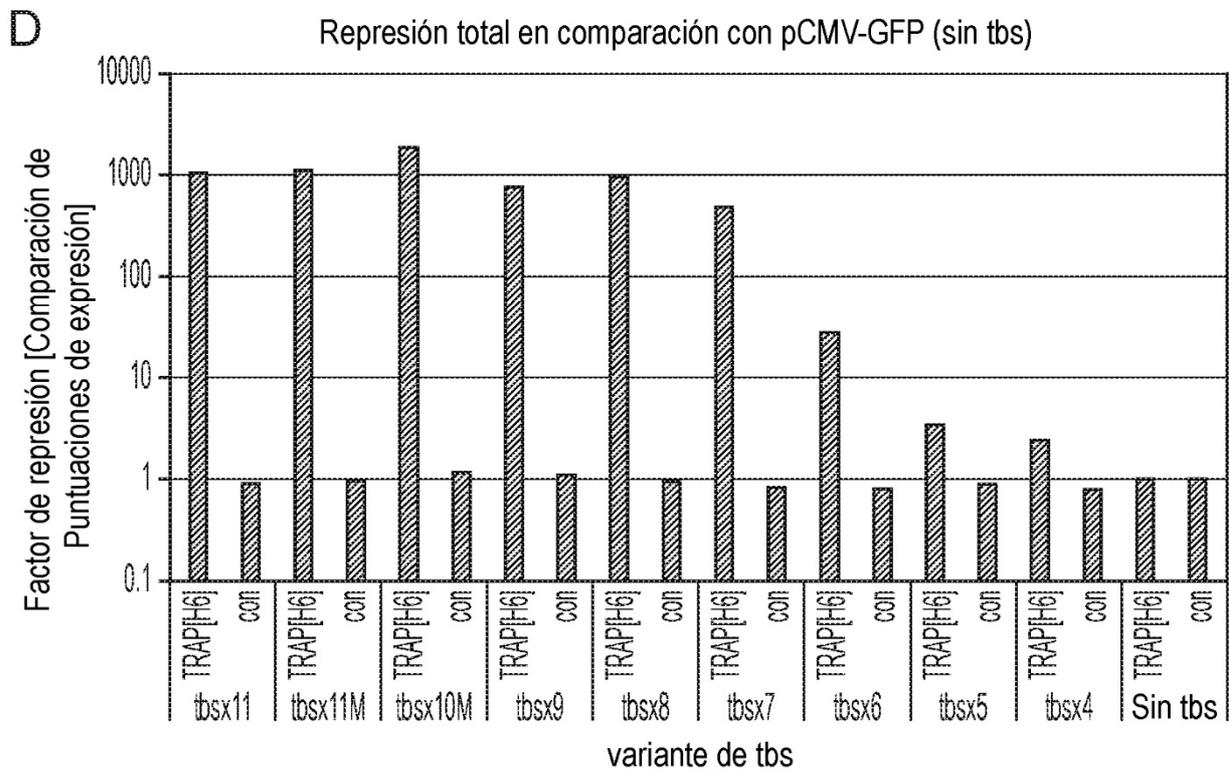
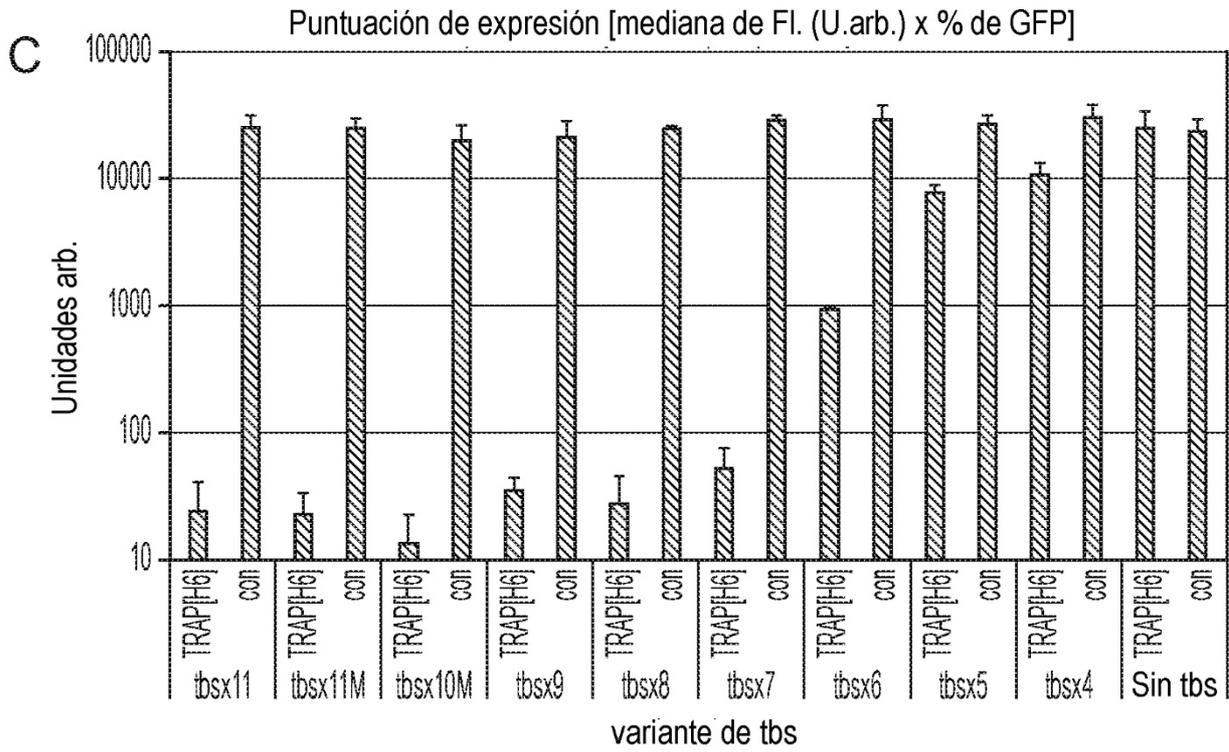


FIG. 14i (continuación)

A

Nombre de variante		secuencia de tbs (variantes de espaciador N ₃ /N ₂)											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
N3x11	(10)	gag	atttag	acggag	ttggag	aaaagag	acggag	accgag	acctag	acagag	aacgag	aaaagag	ct
N3N2x11	(7)	gag	-tttag	acggag	ttggag	aaaagag	acggag	-ccgag	acctag	acagag	aacgag	-aagag	ct
N3N2x11	(5)	gag	-tttag	acggag	-tggag	aaaagag	acggag	-ccgag	acctag	-cagag	aacgag	-aagag	ct
N3N2x11	(3)	gag	-tttag	-cggag	-tggag	aaaagag	acggag	-ccgag	acctag	-cagag	-acgag	-aagag	ct
N3N2x11	(1)	gag	-tttag	-cggag	-tggag	-aagag	acggag	-ccgag	-cctag	-cagag	-acgag	-aagag	ct
N2x11	(0)	gag	-tttag	-cggag	-tggag	-aagag	-cggag	-ccgag	-cctag	-cagag	-acgag	-aagag	ct

[Número de N₃]

B

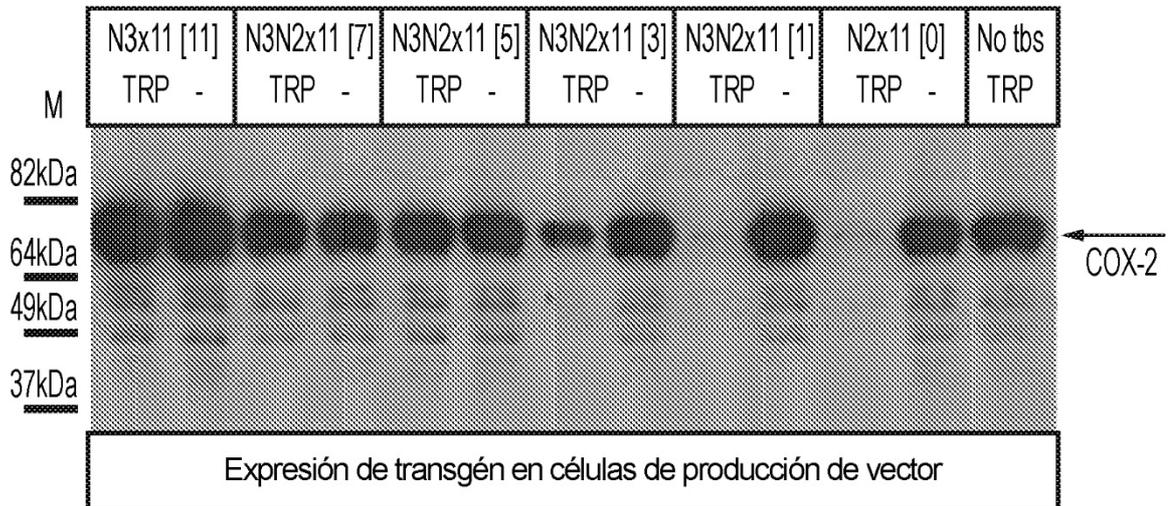


FIG. 14ii

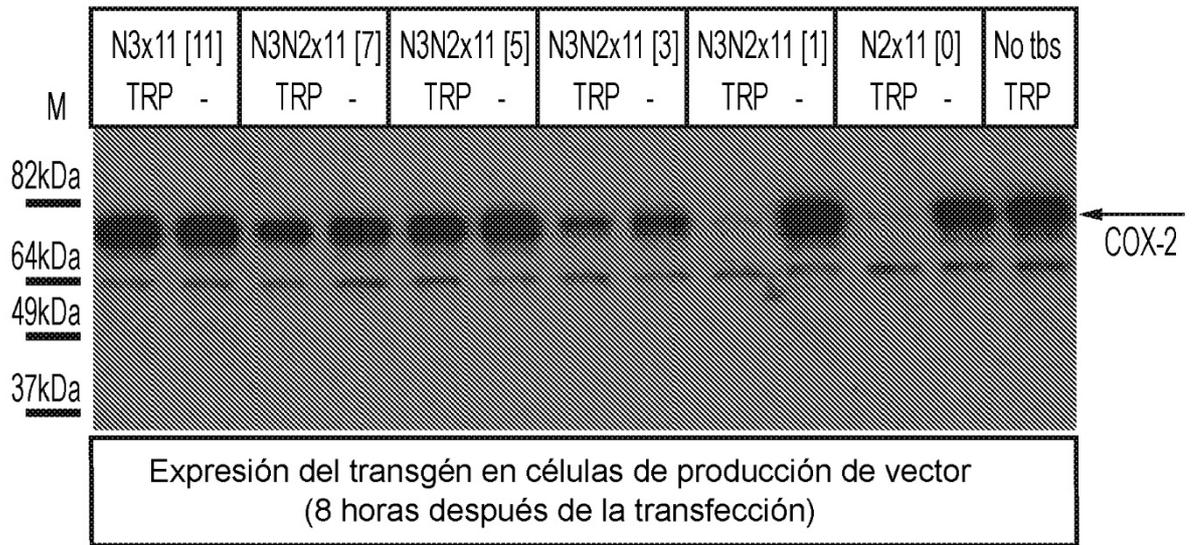


Figura 14iii

Títulos de vectores VAIE-tbsCOX2 que contienen variantes de tbs con un número variable de espaciadores RAGNNN dentro de una tbs con 11x repeticiones [RAGNN]

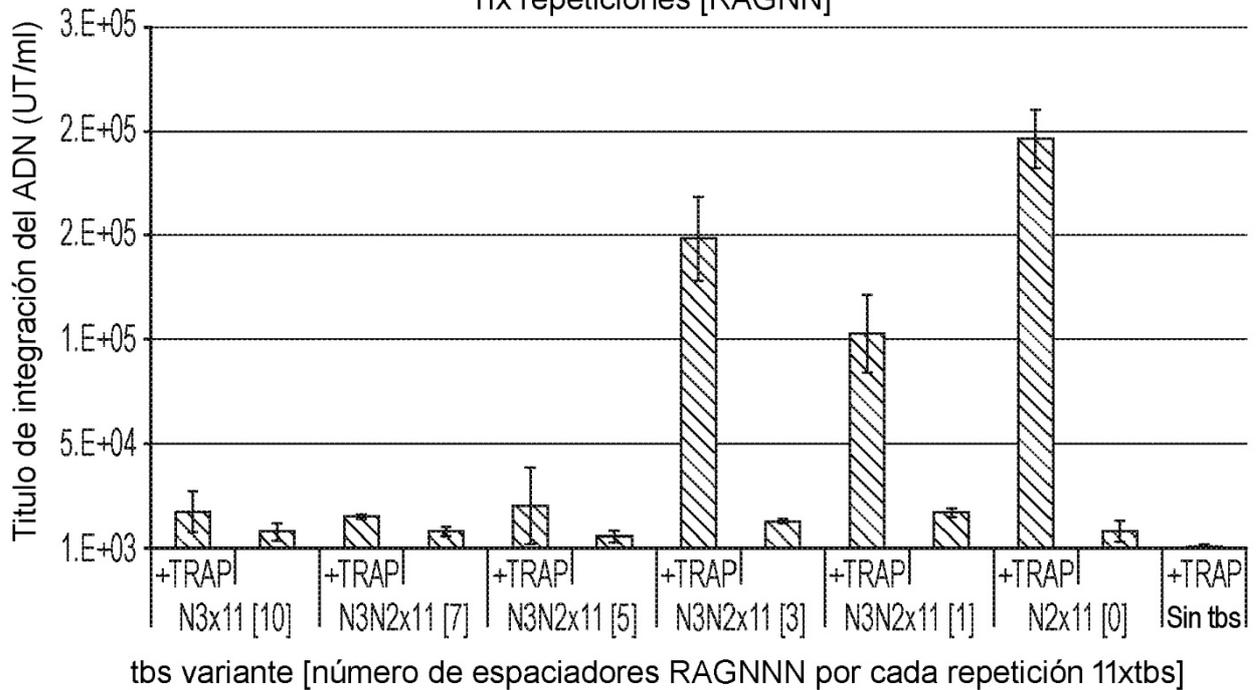


Figura 14iv

A

Nombre de variante		secuencia de tbs (variantes de espaciador N ₃ /N ₂)																					
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11											
N2x11	(0)	gag	ttt	tag	cgg	gag	tgg	gag	-aag	gag	cgg	gag	ccc	gag	cct	tag	cag	gag	acg	gag	aag	gag	ct
N3N2x8	(1)	gag	ttt	tag	cgg	gag	tgg	gag	aaa	gag	cgg	gag	ccc	gag	cct	tag	ca						
N3N2x7	(1)	gag	ttt	tag	cgg	gag	tgg	gag	aaa	gag	cgg	gag	ccc	gag	cc								
N2x7	(0)	gag	ttt	tag	cgg	gag	tgg	gag	-aag	gag	cgg	gag	ccc	gag	cc								
N2x6	(0)	gag	ttt	tag	cgg	gag	tgg	gag	-aag	gag	cgg	gag	cc										
N2x5	(0)	gag	ttt	tag	cgg	gag	tgg	gag	-aag	gag	cg												

[Número de N₃]

B

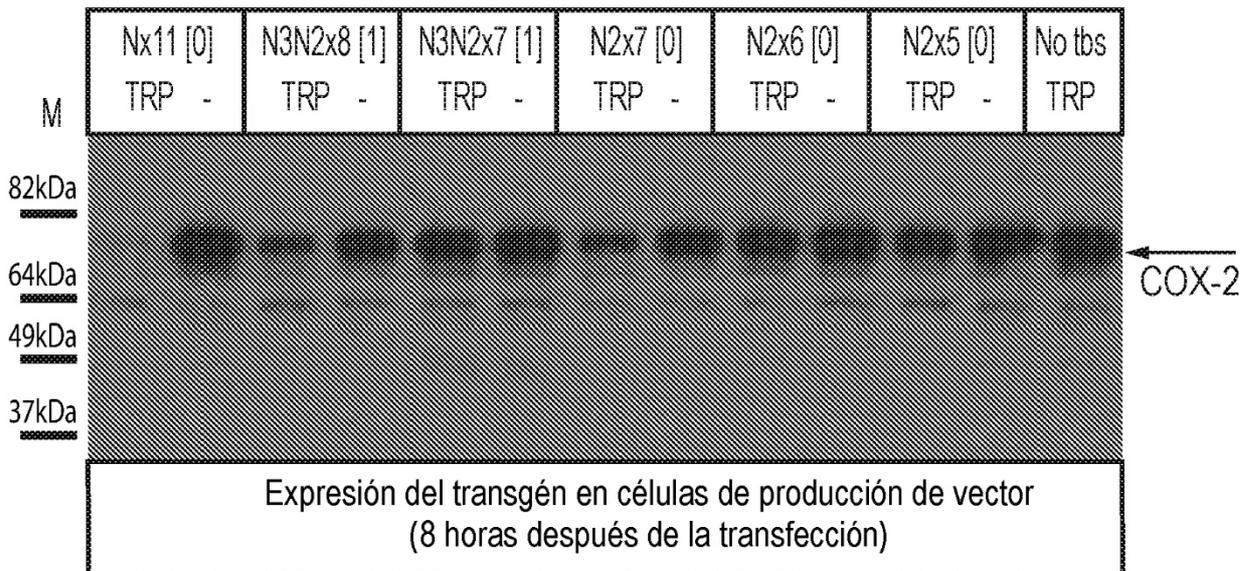


FIG. 14v

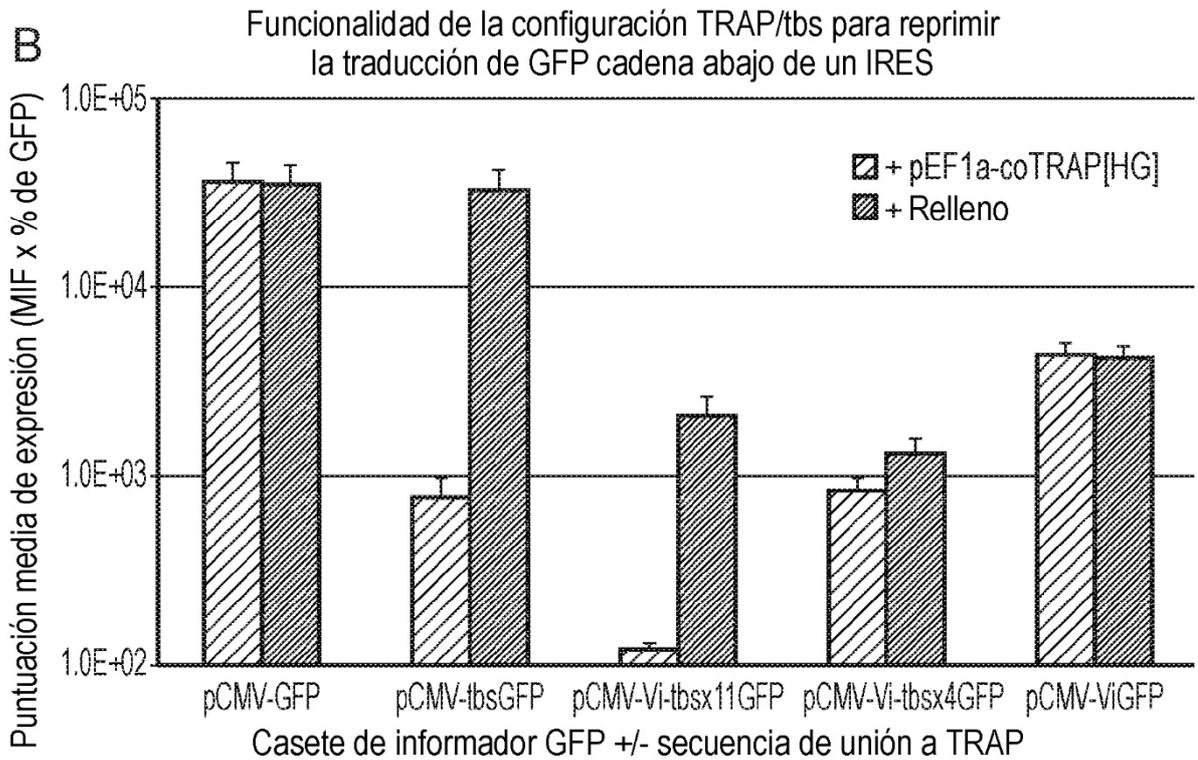
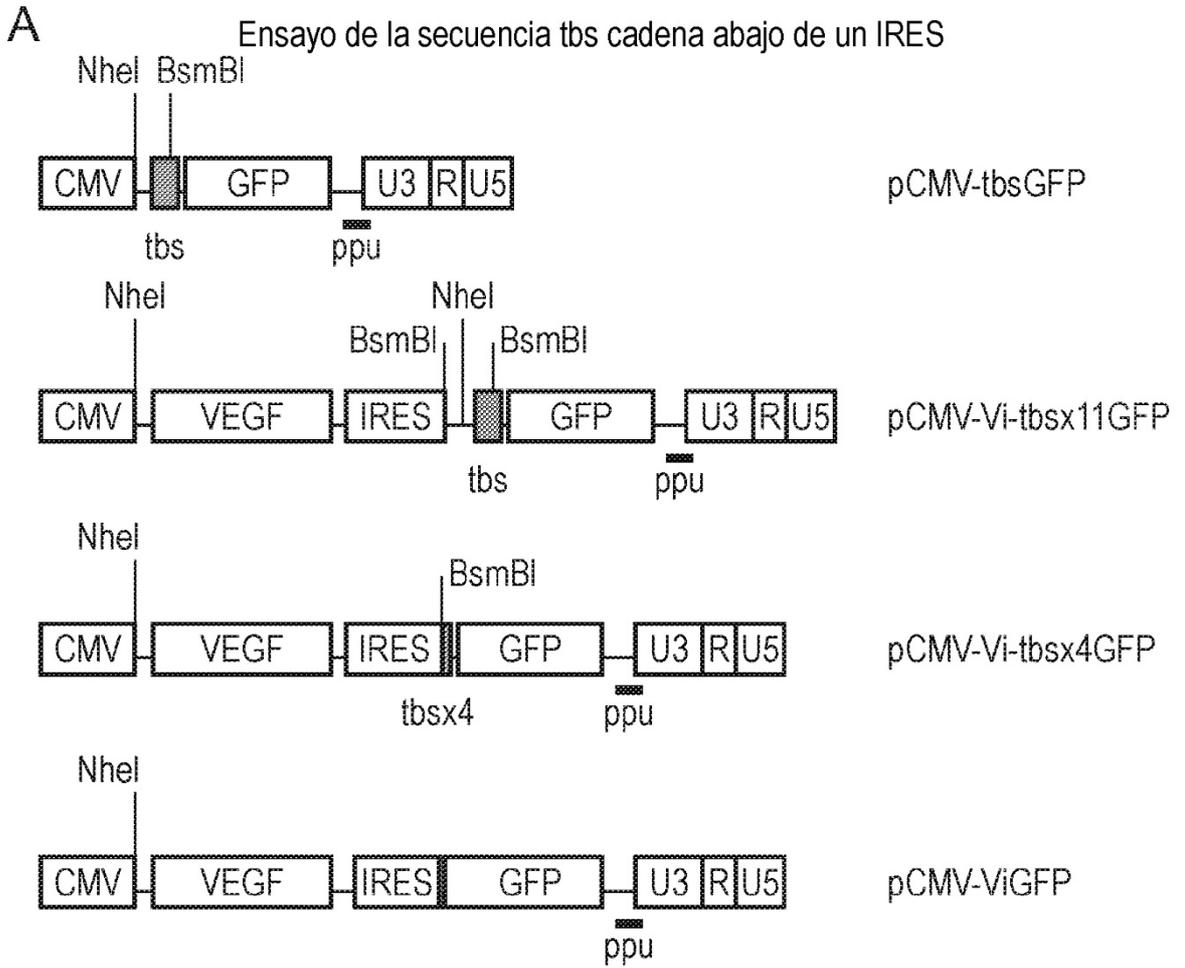


FIG. 15

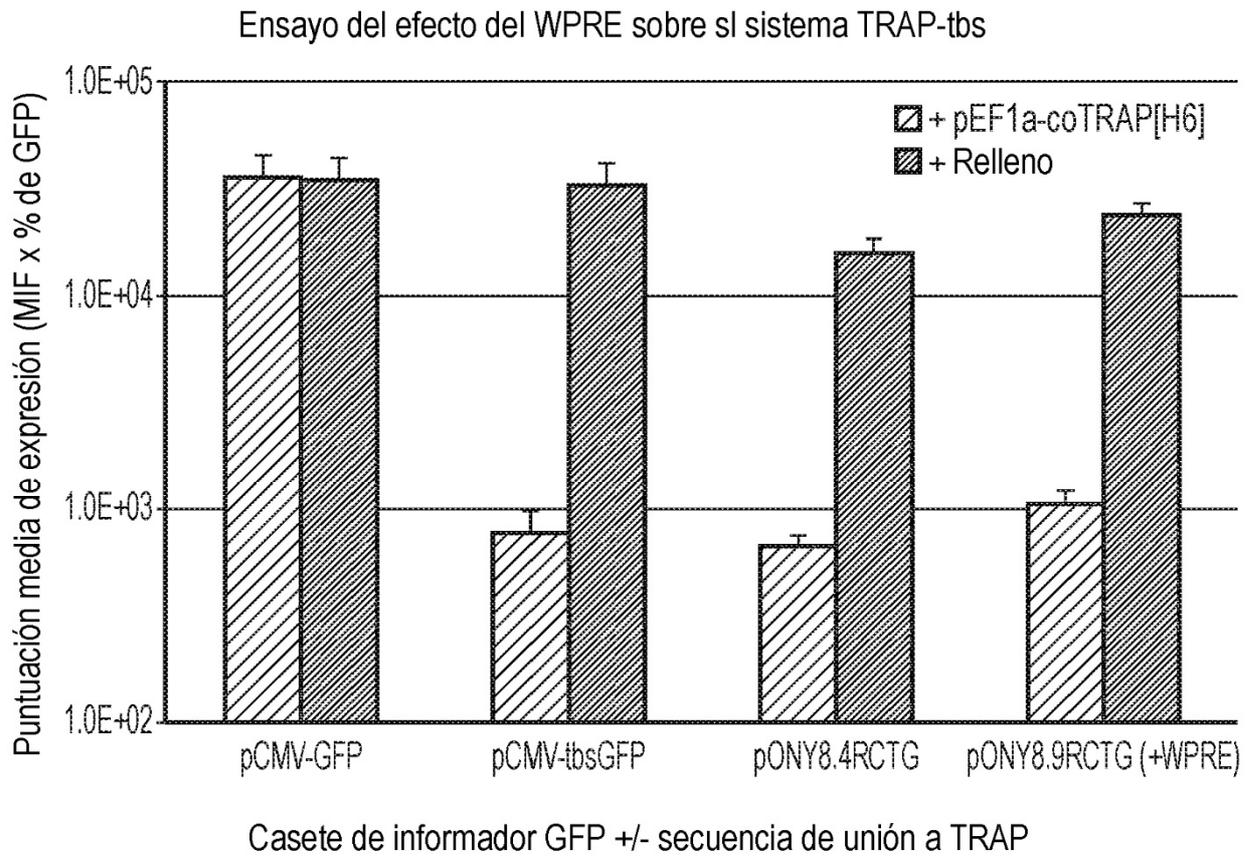


FIG. 16

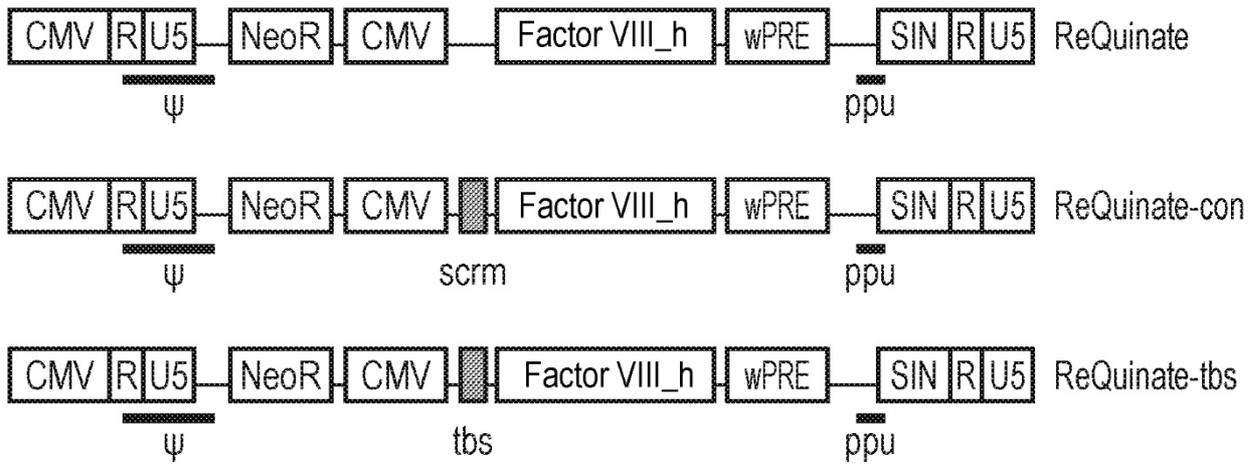


FIG. 17i

El sistema TRIP incrementa los títulos de ReQuinate en 30 veces

A La represión del Factor VIII en células de producción incrementa el título de ReQuinate mediante un pseudotipado mejorado de VSV-G

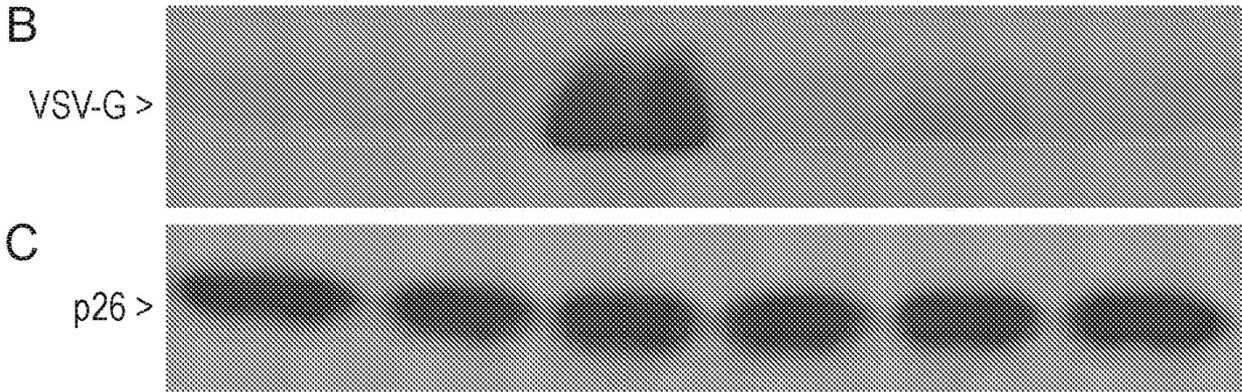
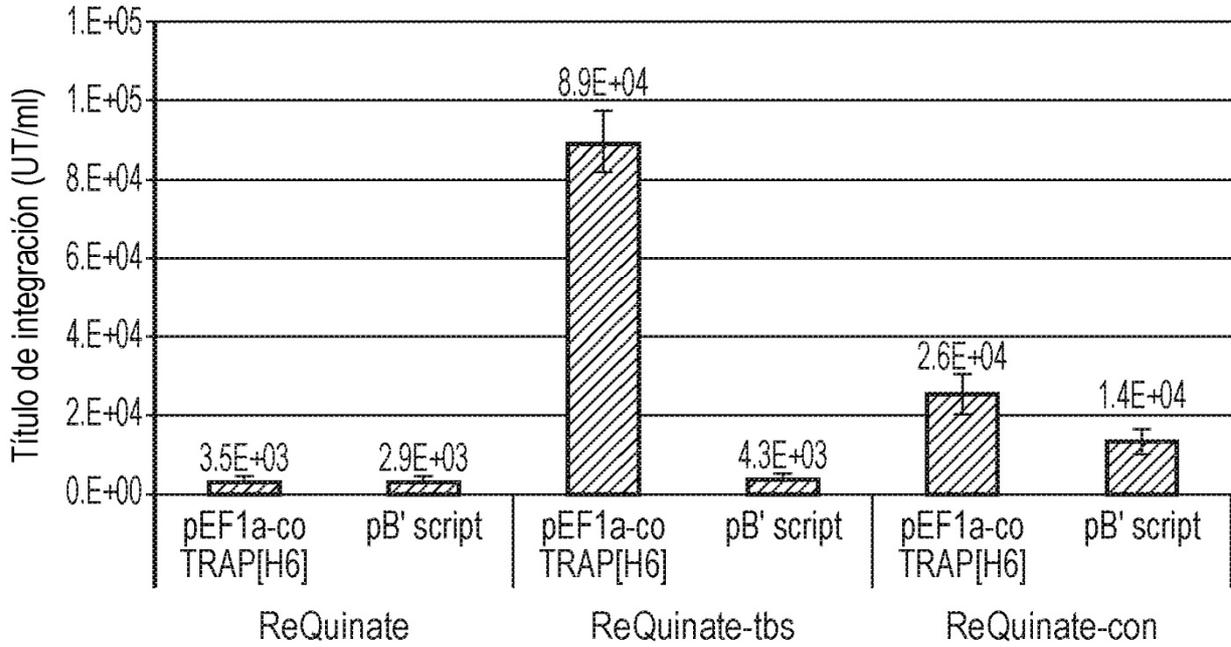


FIG. 17ii

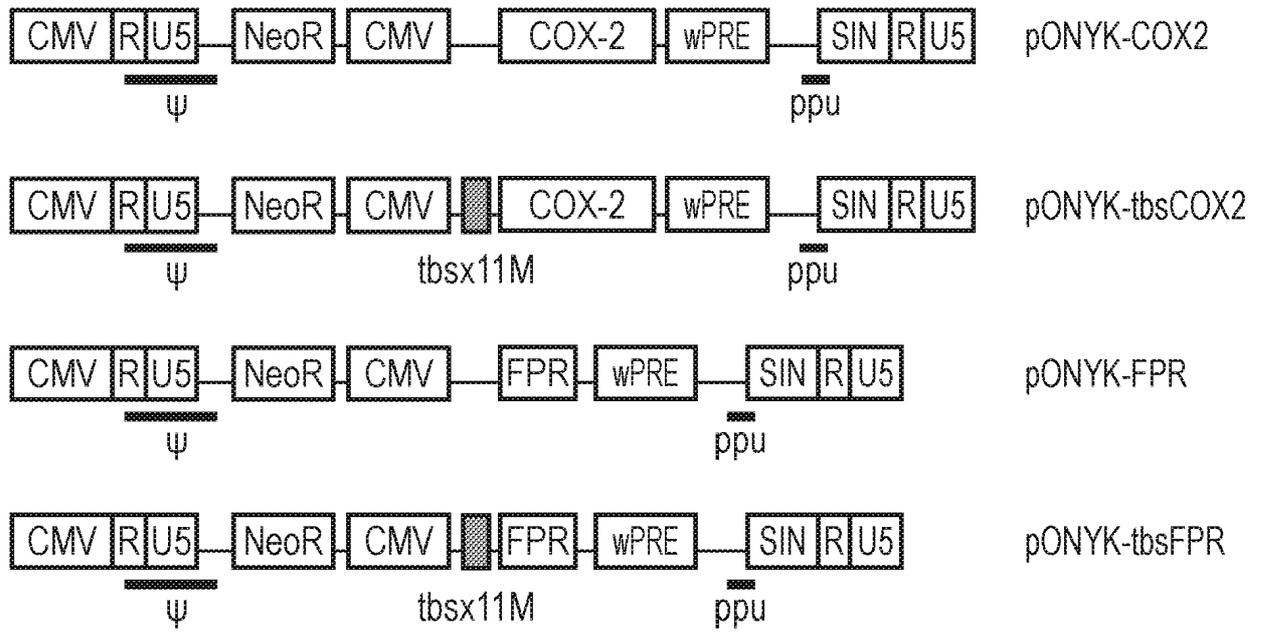


FIG. 18i

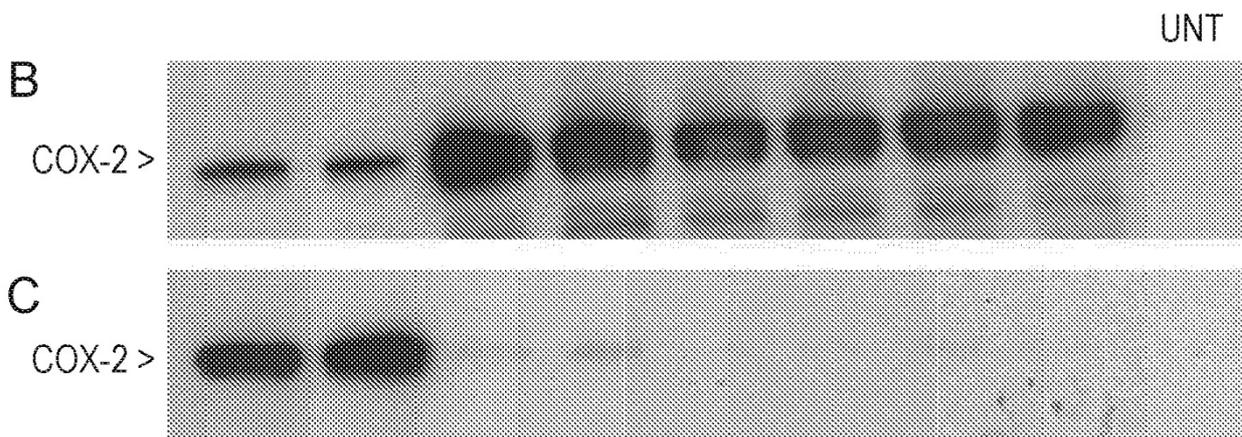
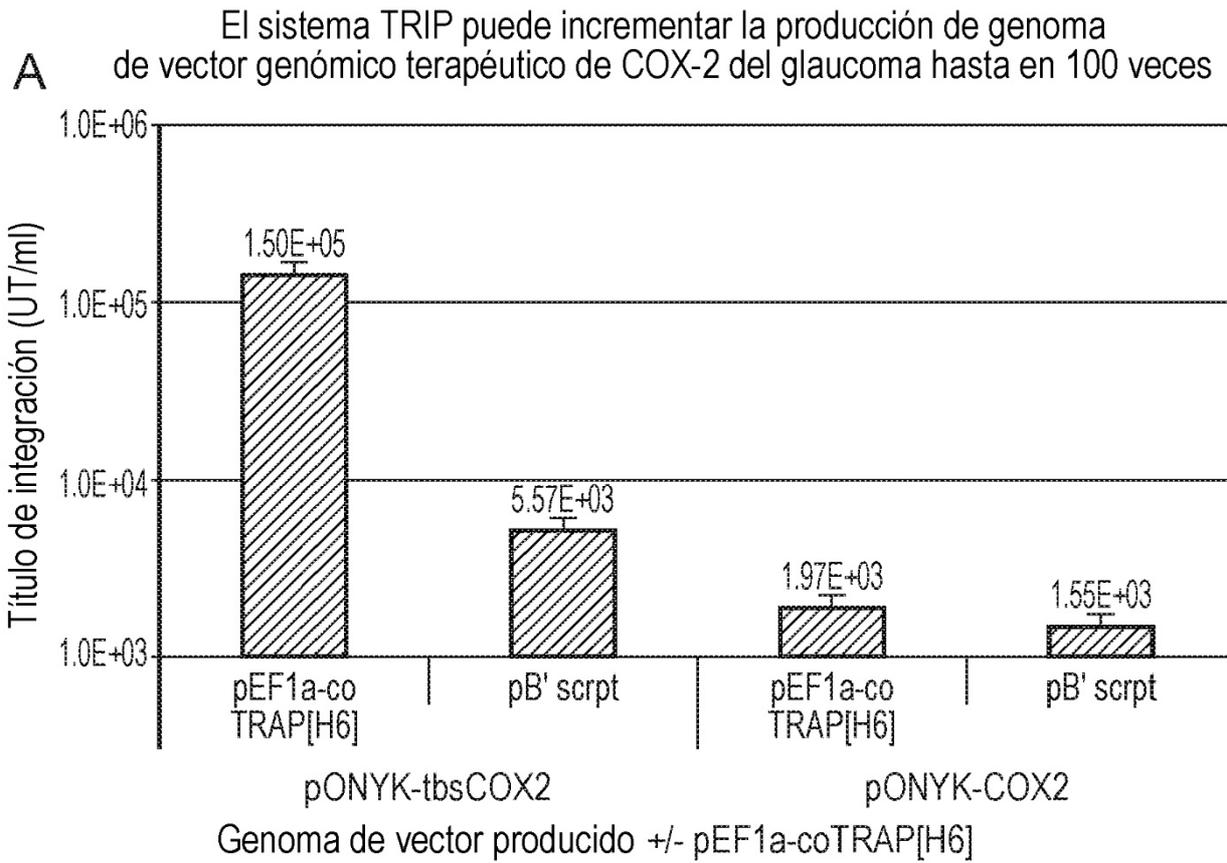


FIG. 18ii

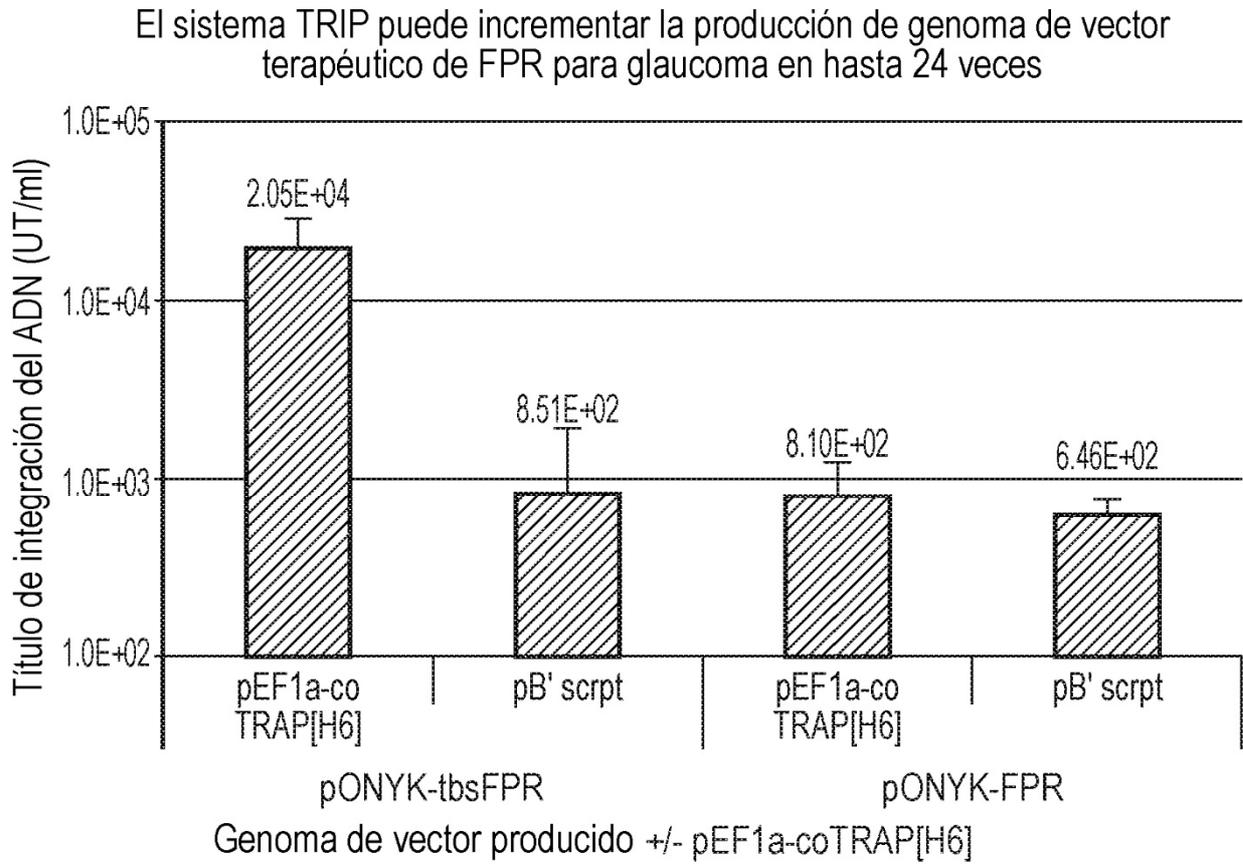


FIG. 18iii

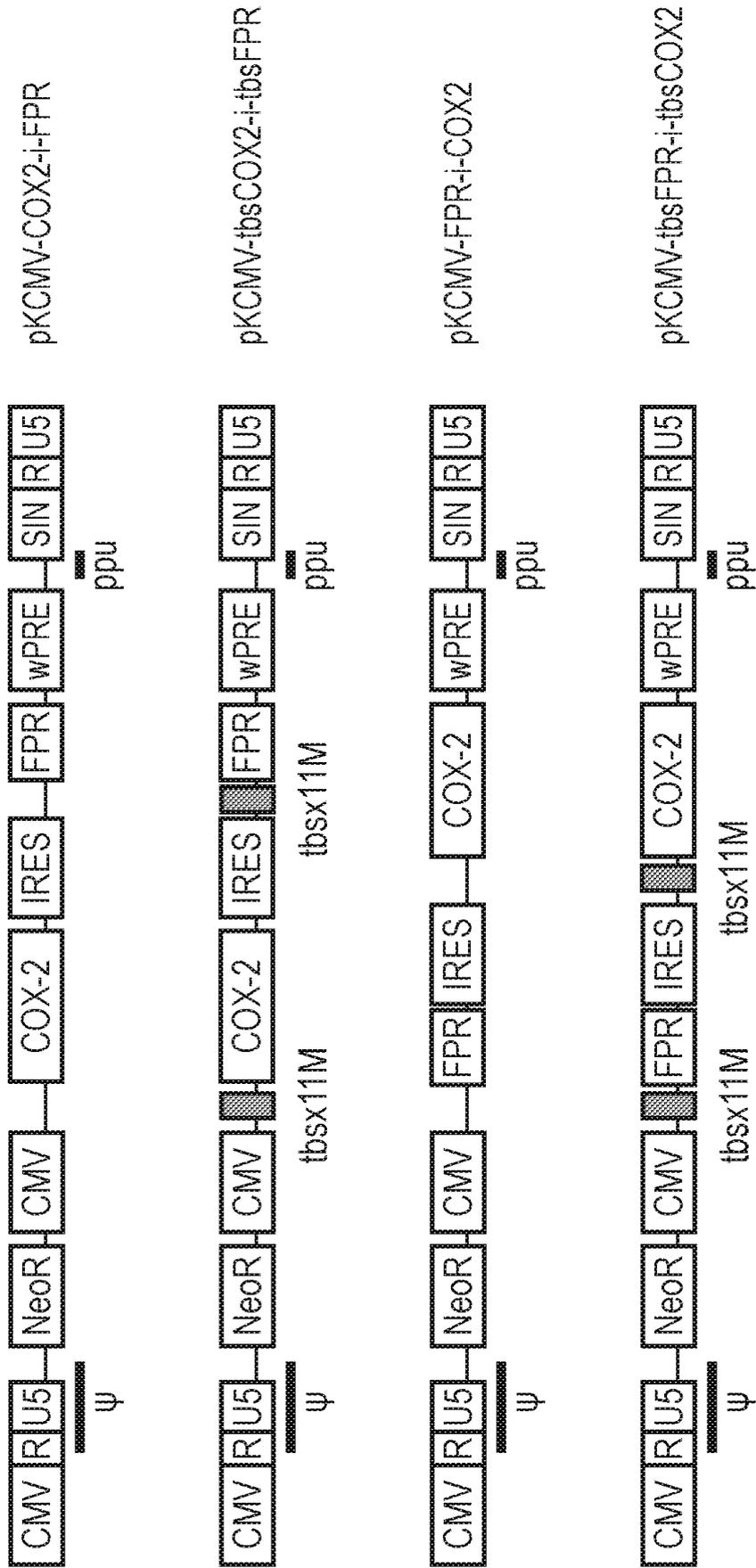


FIG. 19i

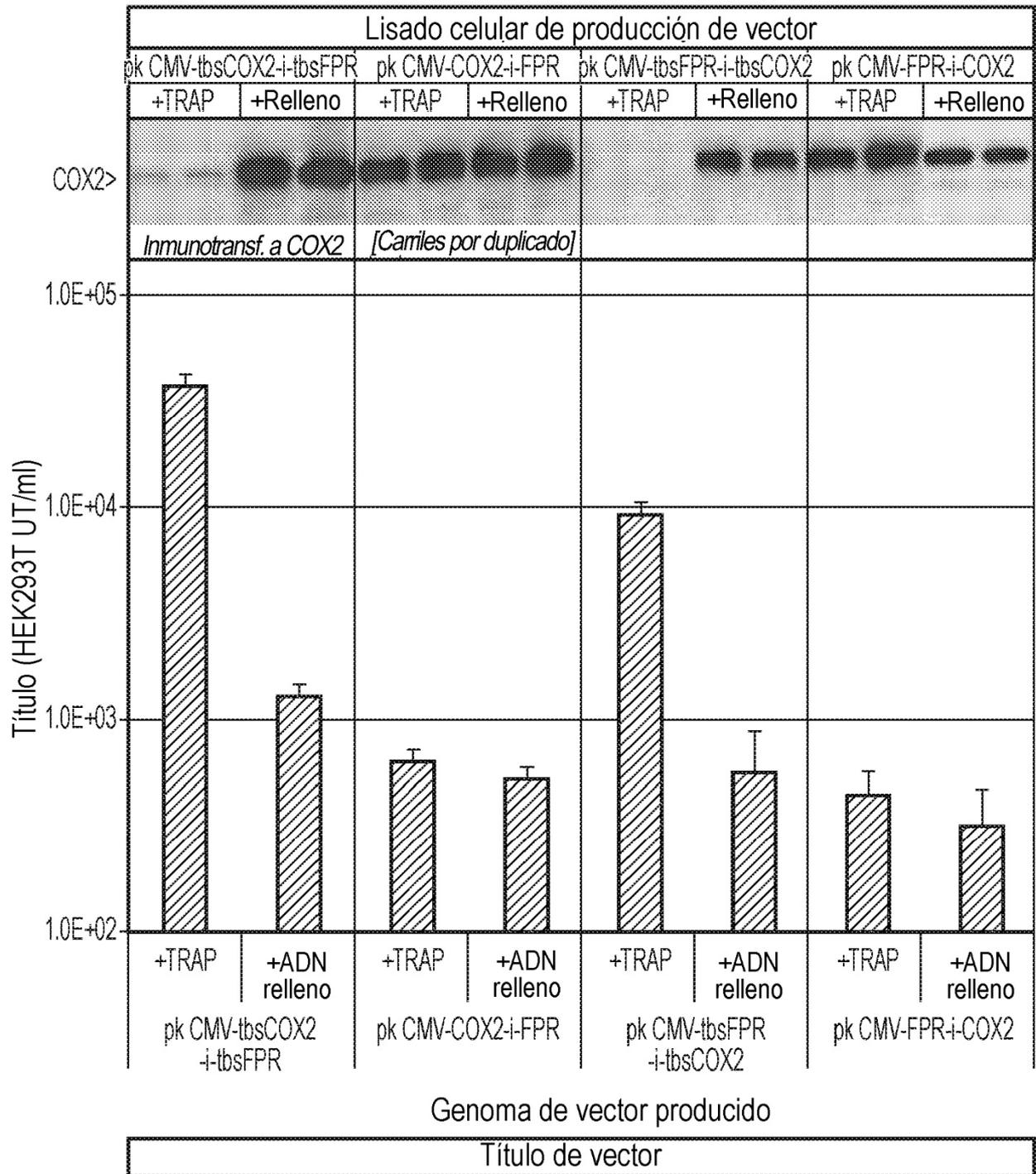


FIG. 19ii

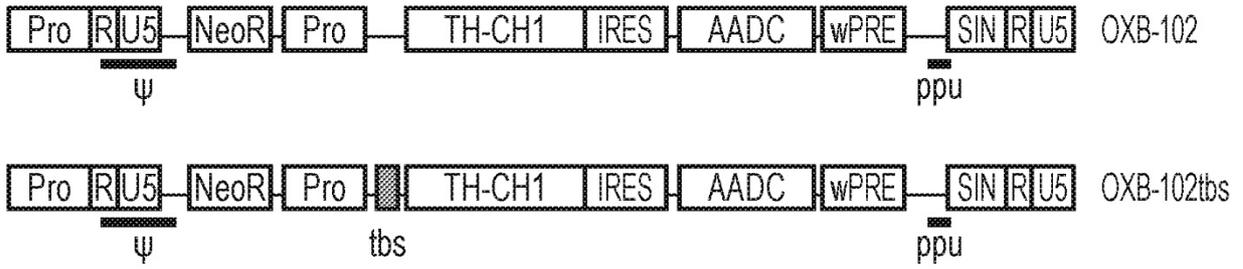


FIG. 20i

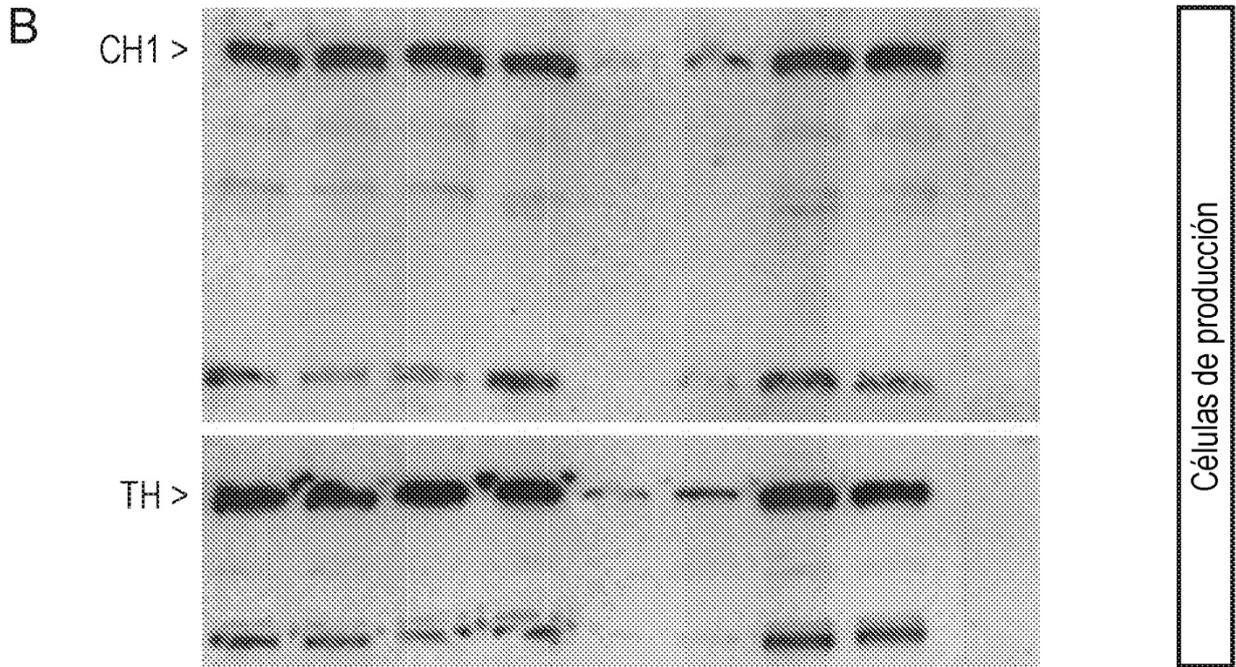
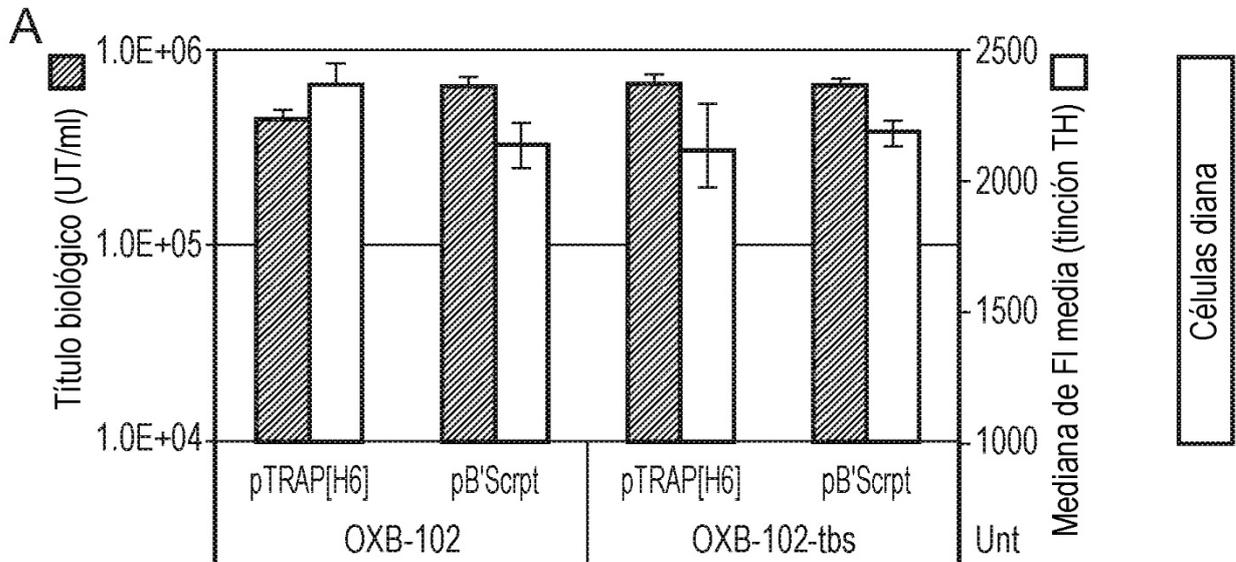
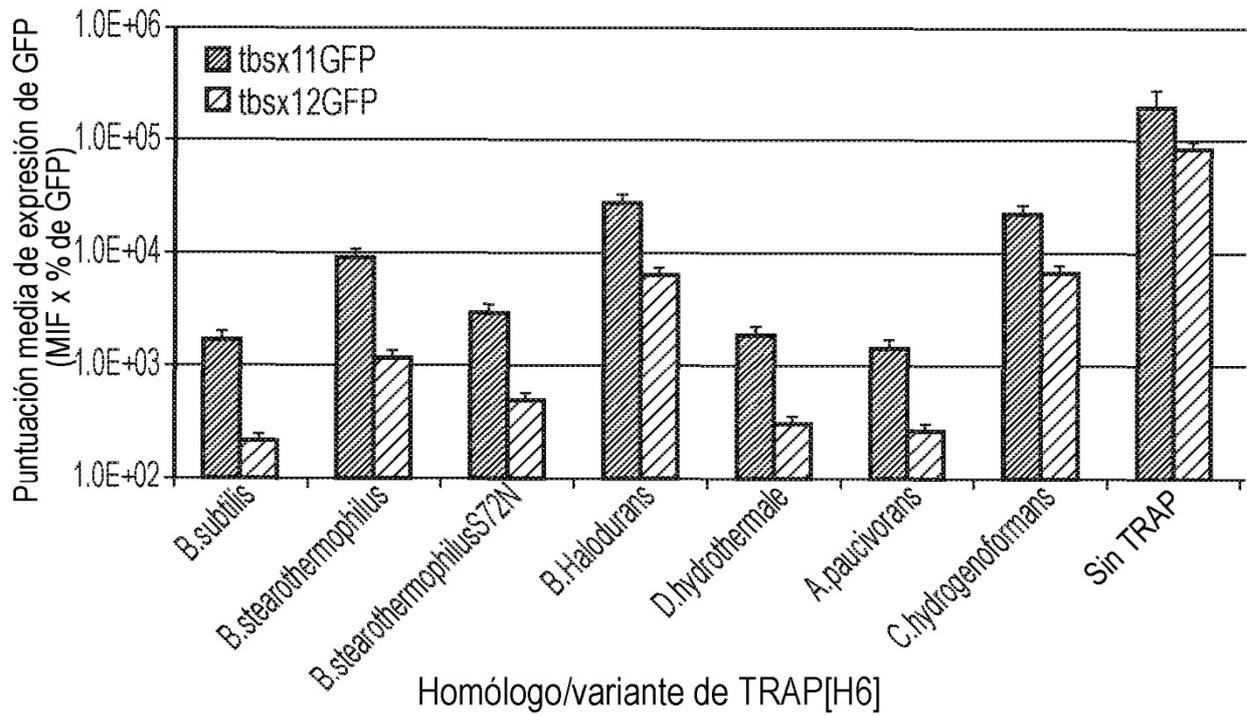


FIG. 20ii

Organismo	Linaje bacteriano	Ref. del NCBI
<i>Bacillus subtilis</i>	Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus	WP_003230576.1
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Geobacillus	WP_033013997.1
<i>Bacillus halodurans</i>	Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus	WP_010897809.1
<i>Desulfotomaculum hydrothermale</i>	Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Peptococcaceae; Desulfotomaculum	WP_008413223.1
<i>Aminomonas paucivorans</i>	Synergistetes; Synergista; Synergistales; Synergistaceae; Aminomonas	WP_006300896.1
<i>Carboxydothermus hydrogeniformans</i>	Firmicutes; Clostridia; Thermoanaerobacteriales; Thermoanaerobacteraceae; Carboxydothermus	WP_011344060.1

FIG. 21i

A Funcionalidad de diferentes homólogos/variantes de TRAP en la represión de la expresión del transgén a partir de casetes informadores x11 y x12 tbs



B Factor de represión de diferentes homólogos/variantes de TRAP en la represión de la expresión del transgén a partir de casetes informadores x11 y x12 tbs

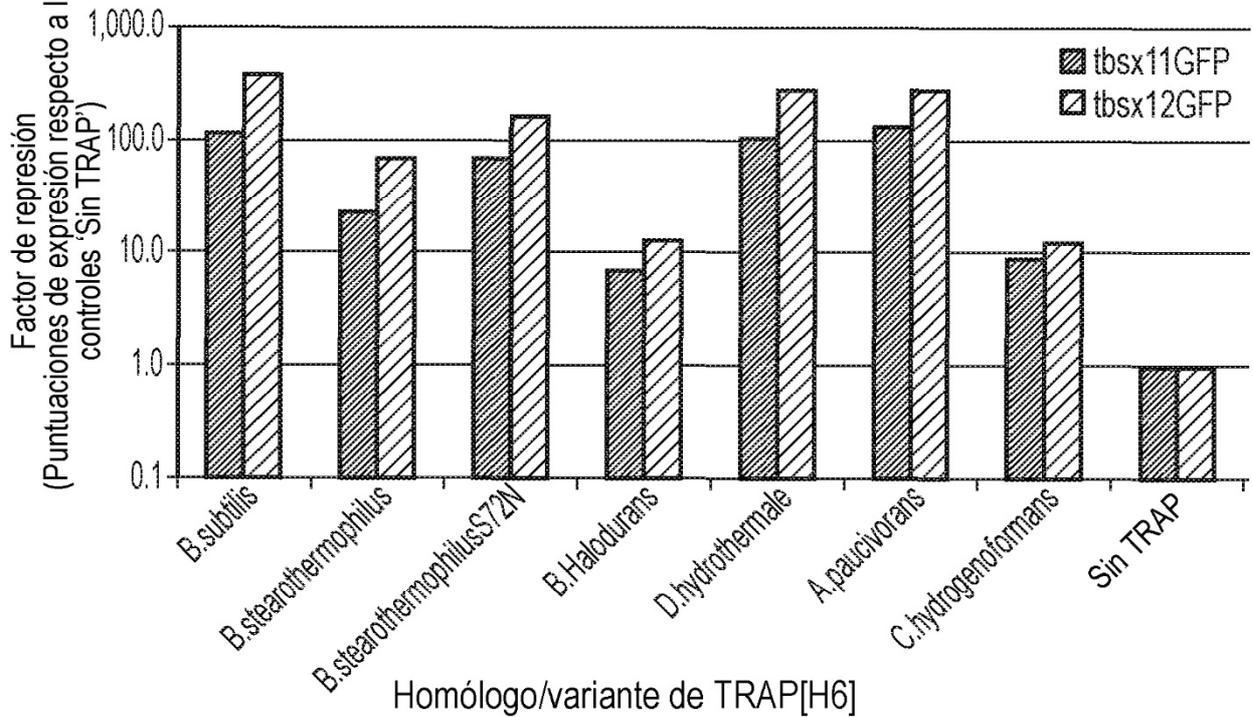


FIG. 21ii



FIG. 22i

A Represión de la expresión de GFP en subclones de HEK293T que expresan establemente TRAP[H6] de *B. subtilis*

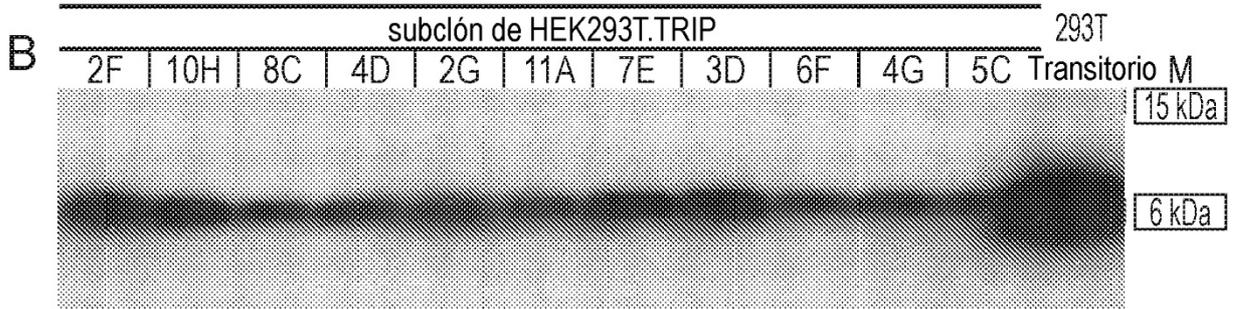
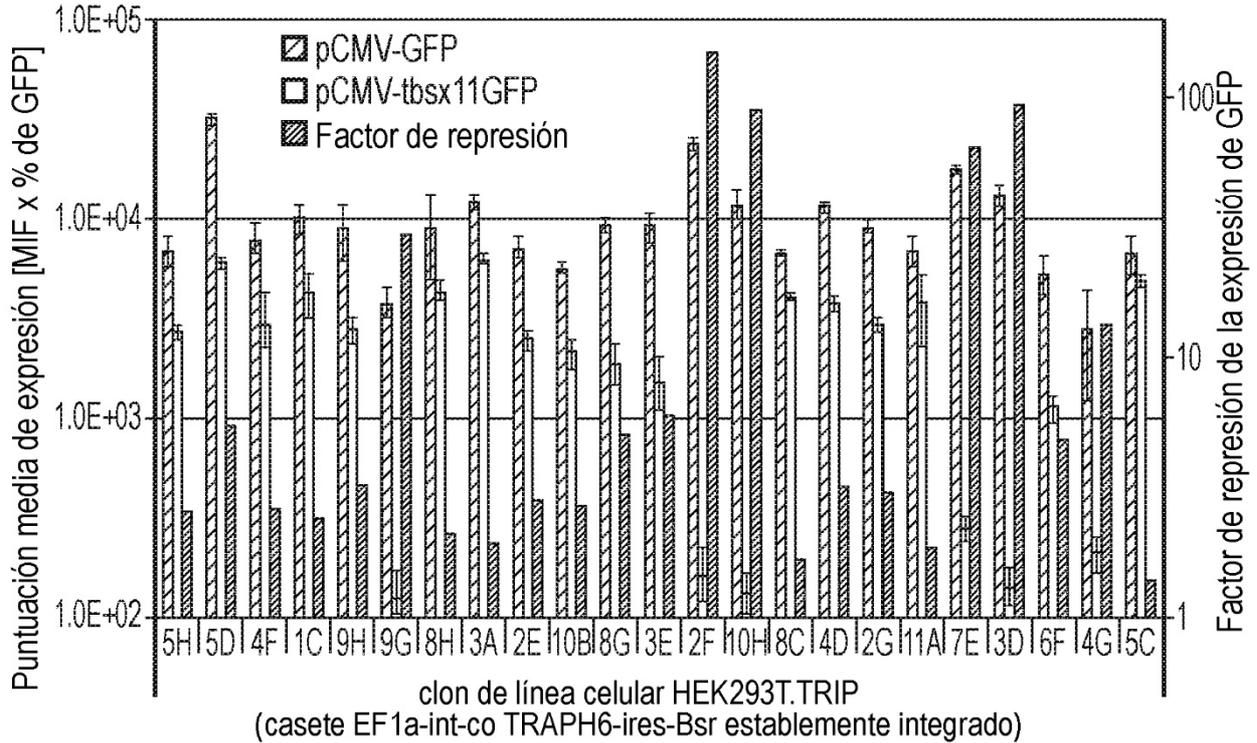


FIG. 22ii

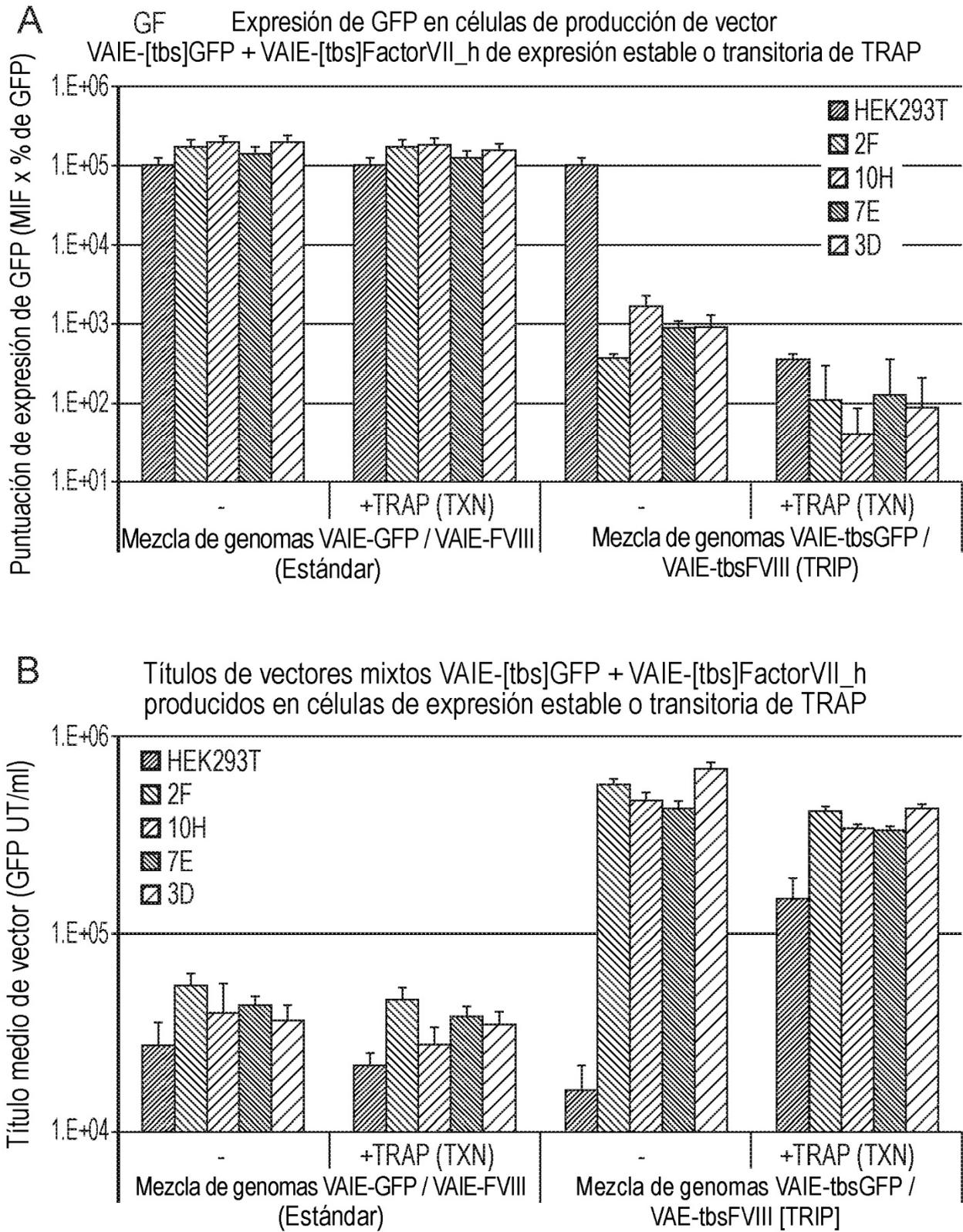


FIG. 22iii

Partículas de vector VAIE-[tbs]GFP / VAIE-[tbs]FVIII_hu producidas a partir de células que expresan TRAP[H6]

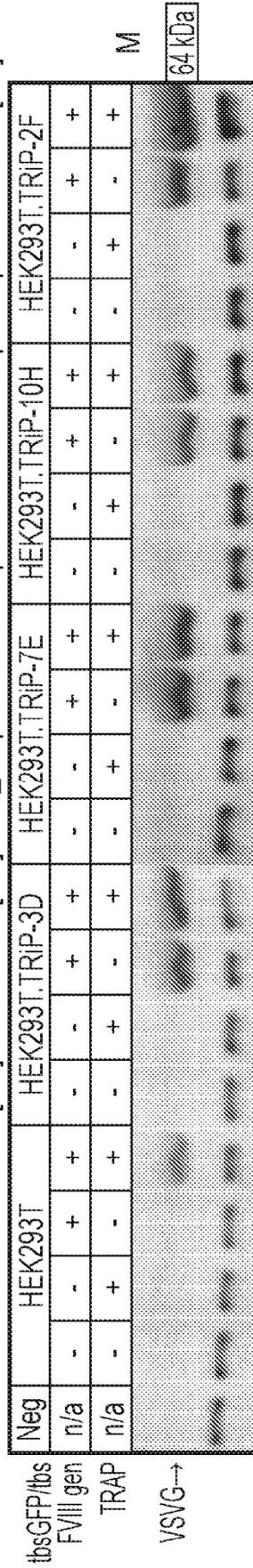


FIG. 22iv

Títulos en bruto de vector lentivirico terapéutico mejorado
utilizando células HEK293T-TRIP

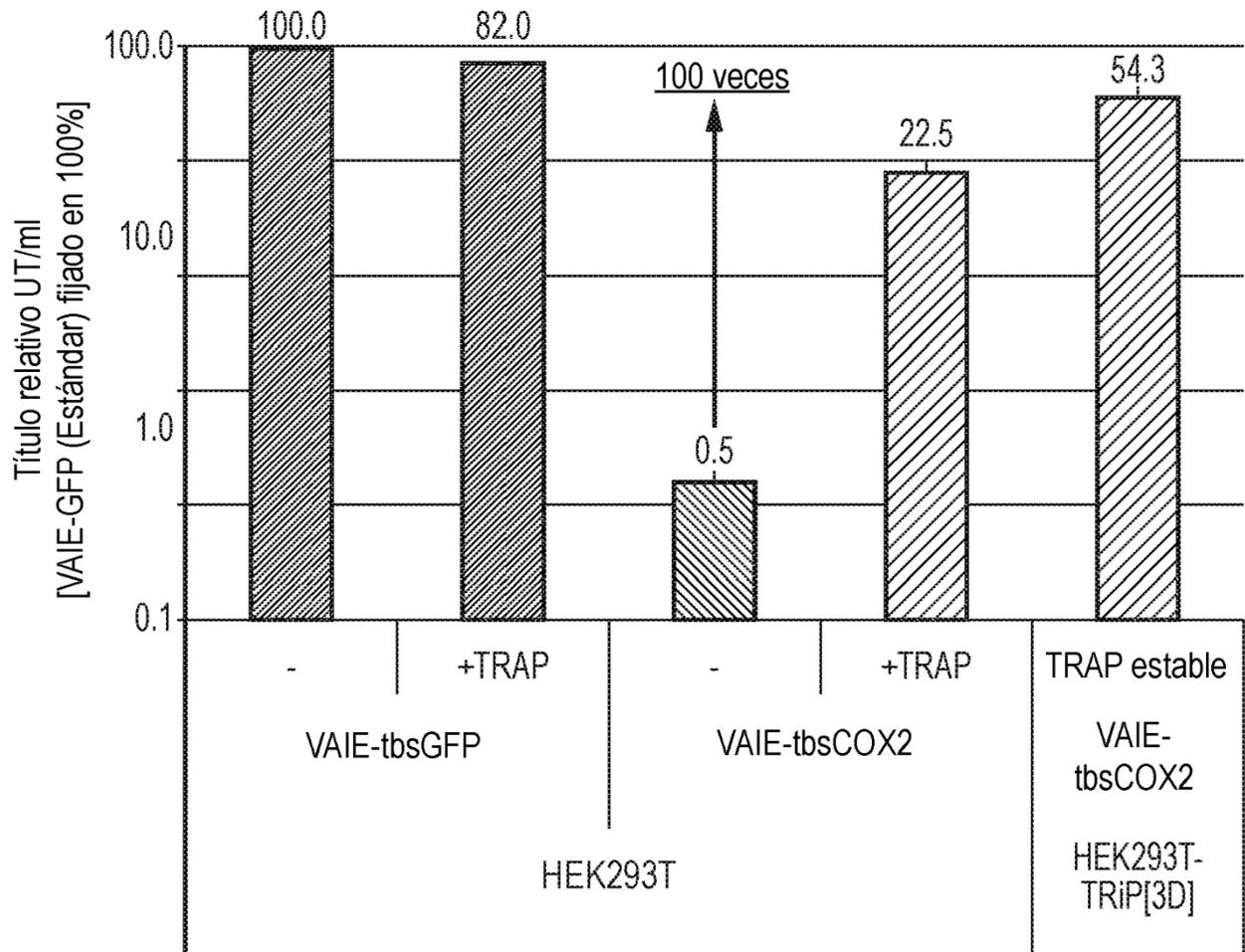


FIG. 22v

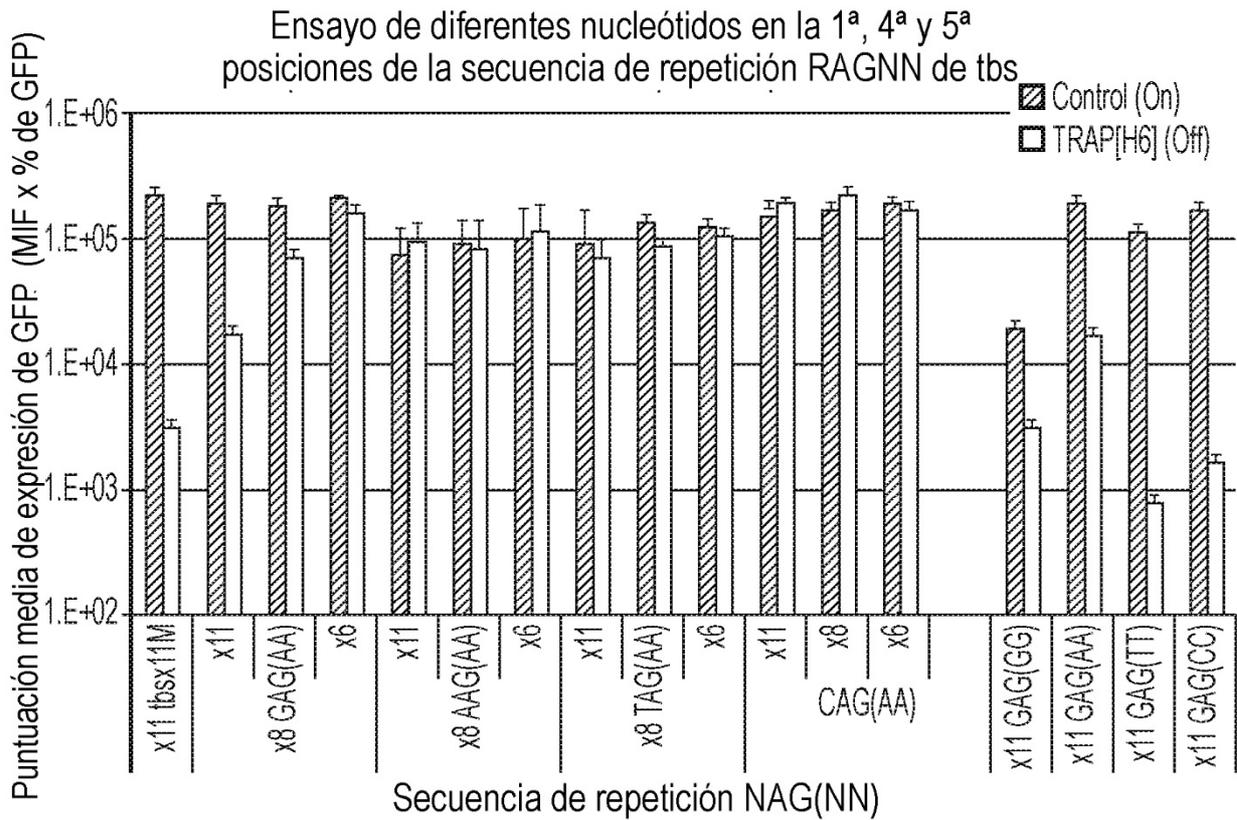


FIG. 23i

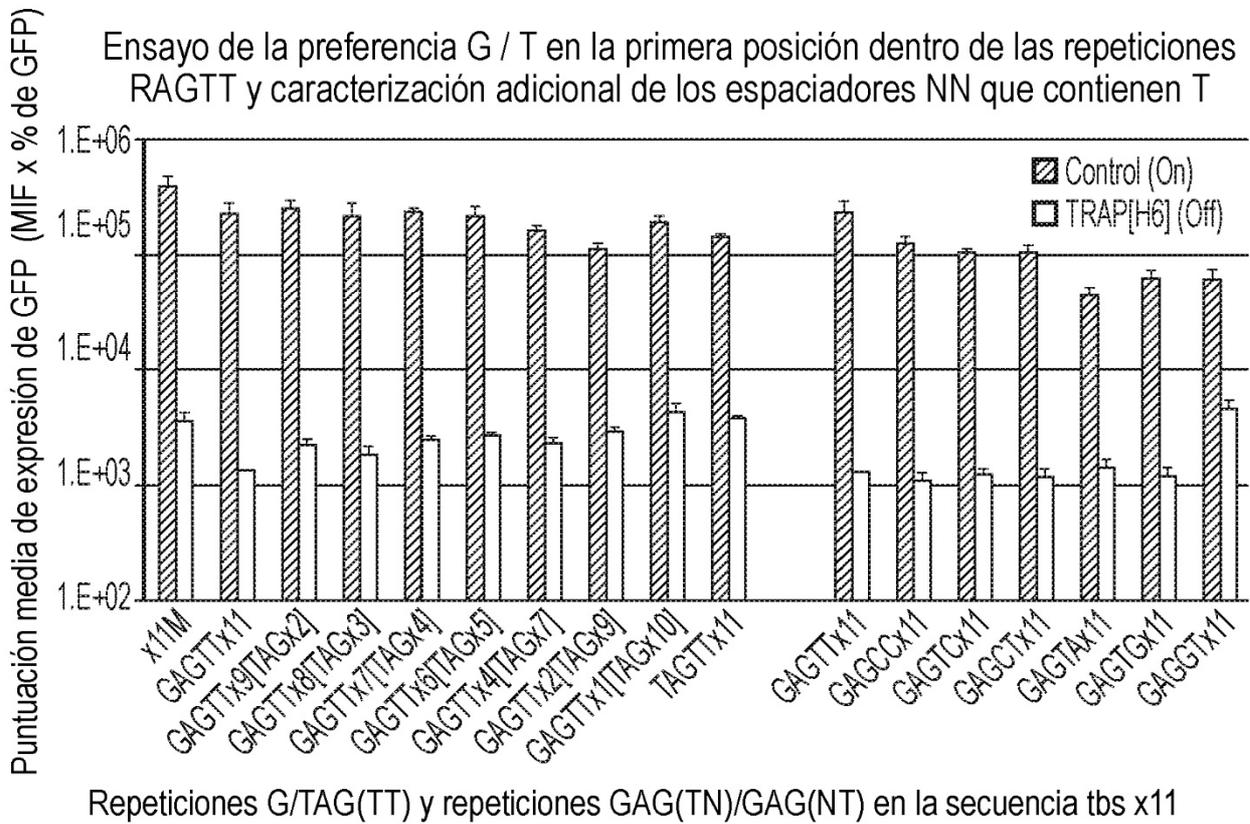


FIG. 23ii

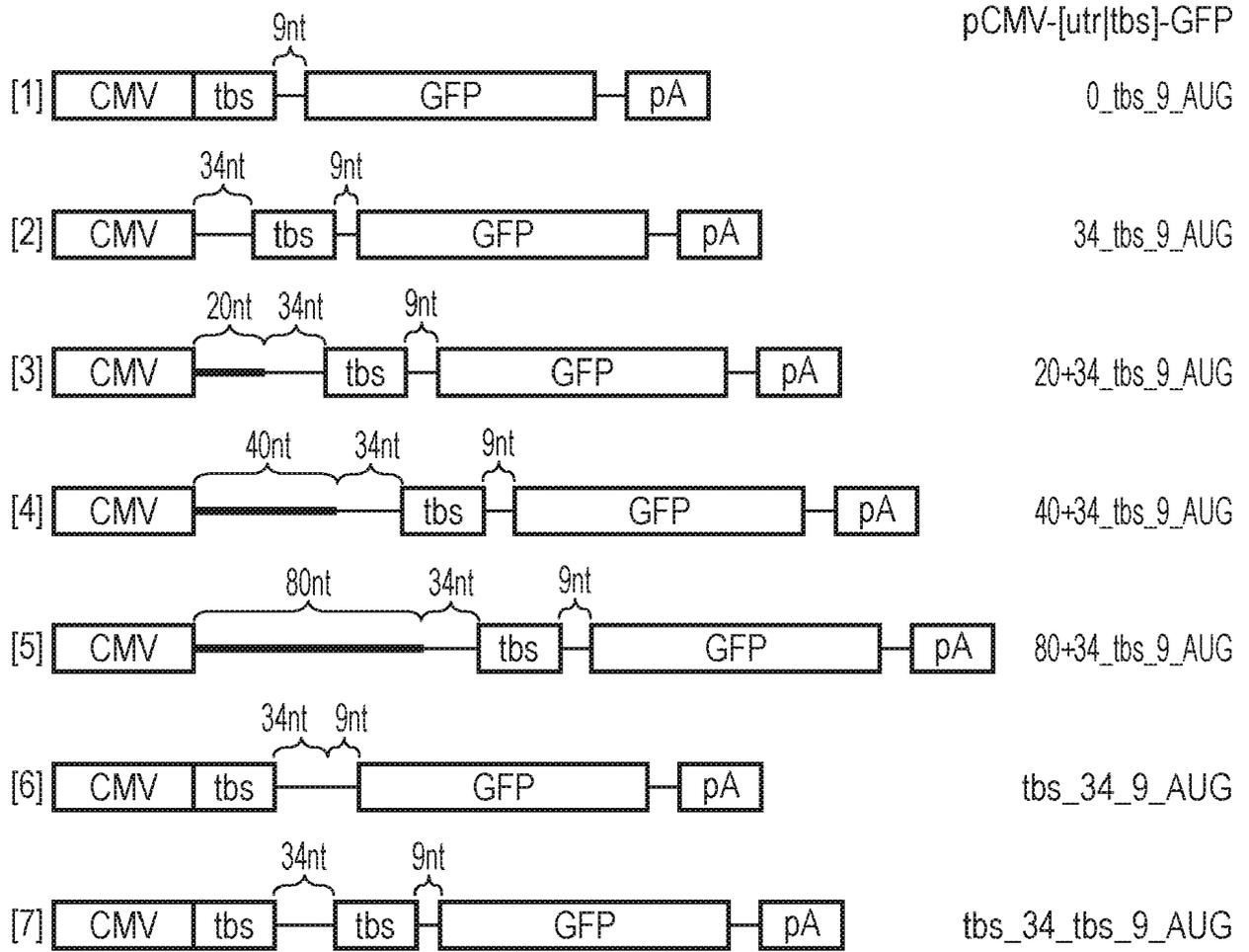
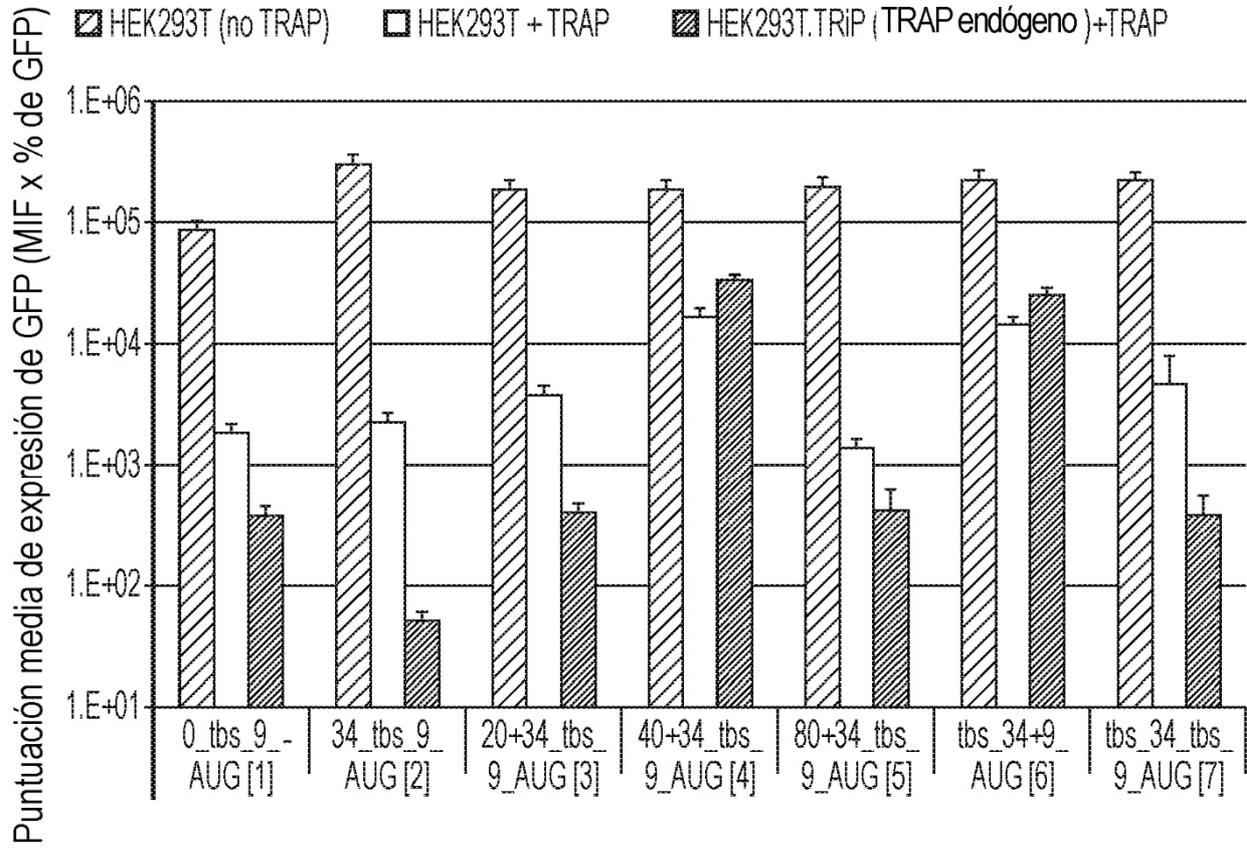


FIG. 24i

Ensayo de la funcionalidad de la secuencia tbs en diferentes posiciones de la 5'UTR del transgén en células HEK293T y células HEK293T.TRIP (TRAP estable)



el contexto en 5'UTR [nº de constructo]

variante de 5'UTR / tbs-informador GFP

FIG. 24ii

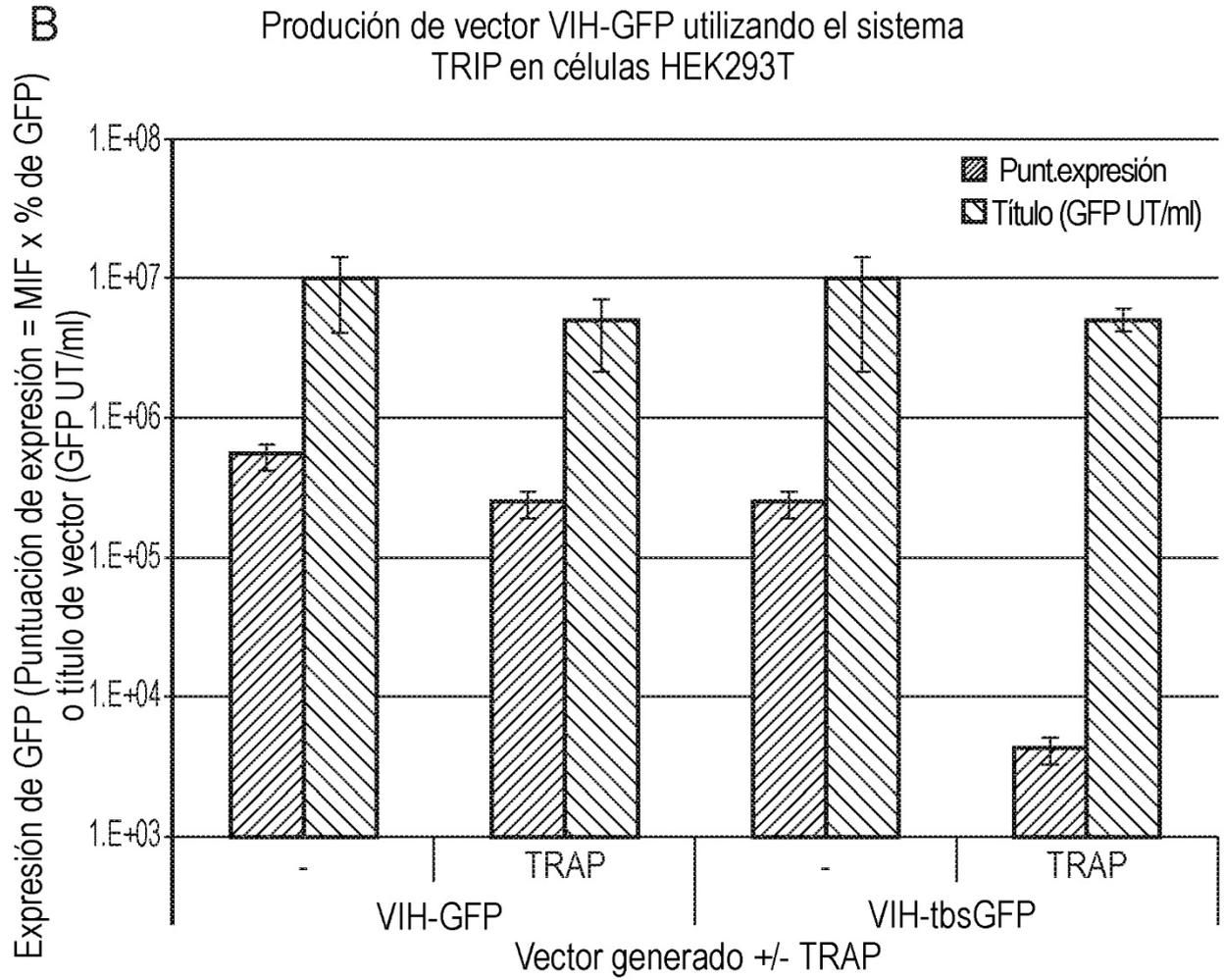
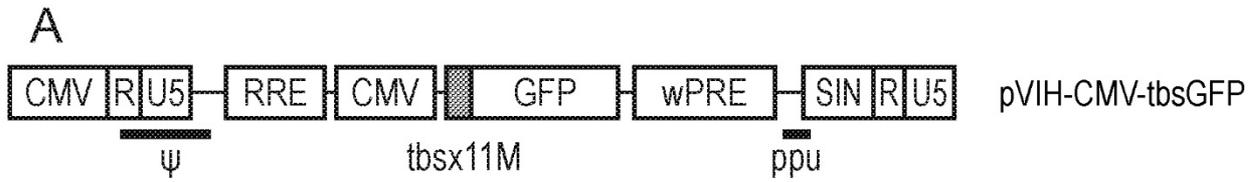
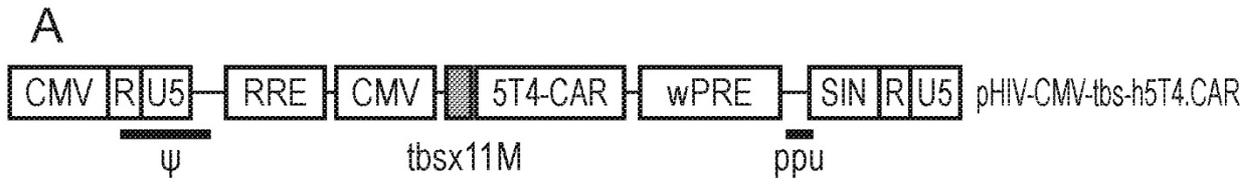


FIG. 25i



B Mejora de los títulos de vector terapéutico basado en 5T4-CAR VIH utilizando el sistema TRIP en células HEK293T

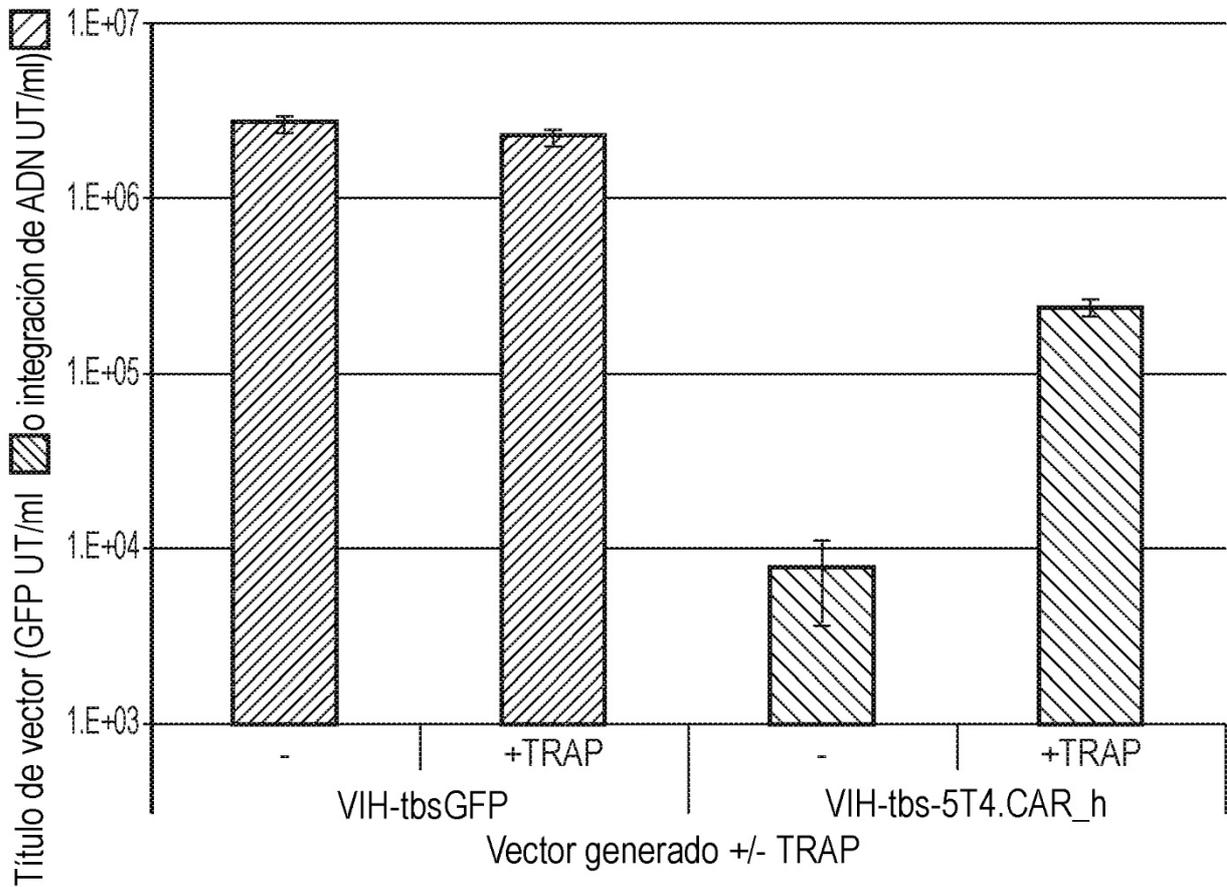


FIG. 25ii

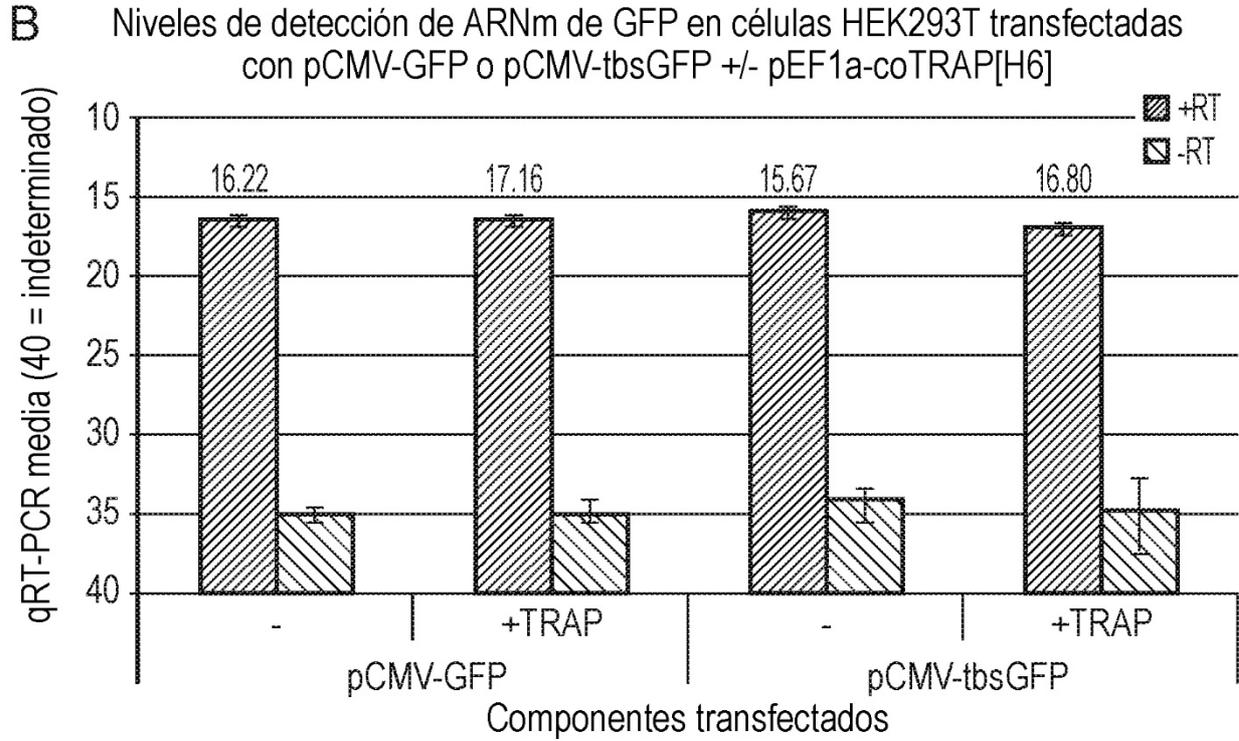
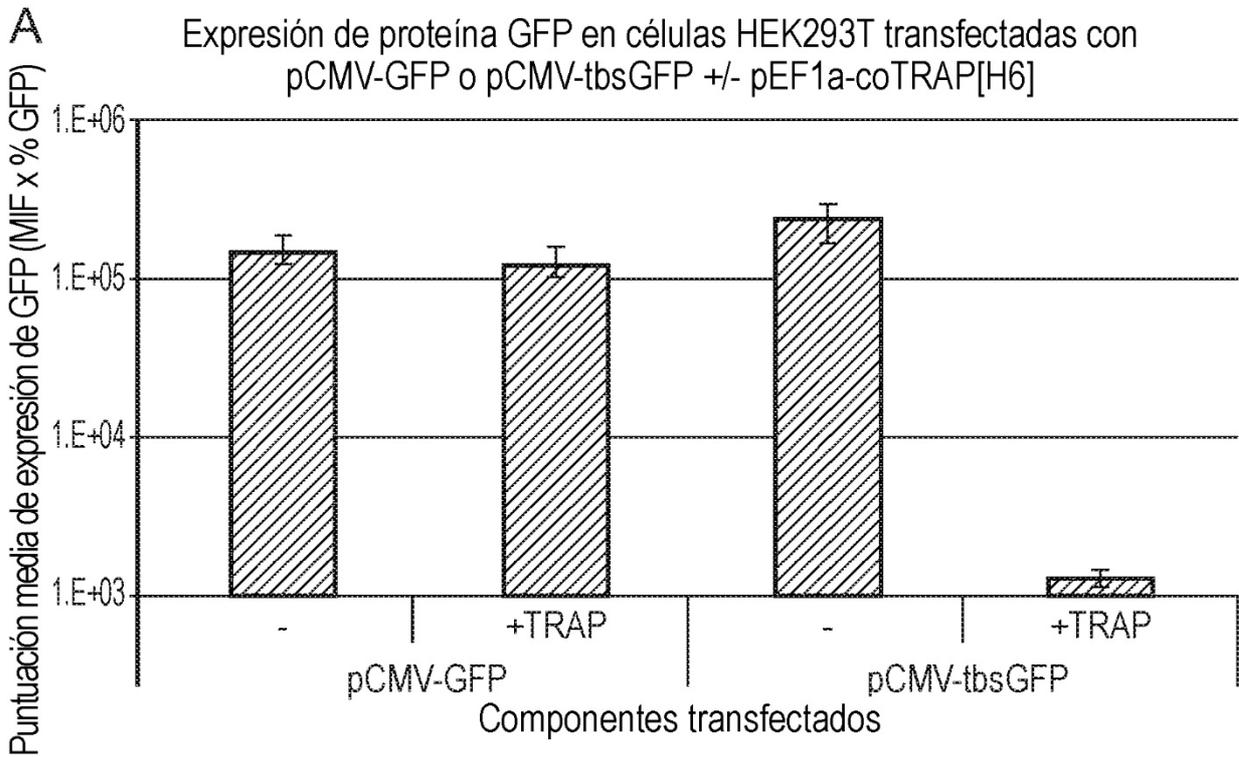


FIG. 26

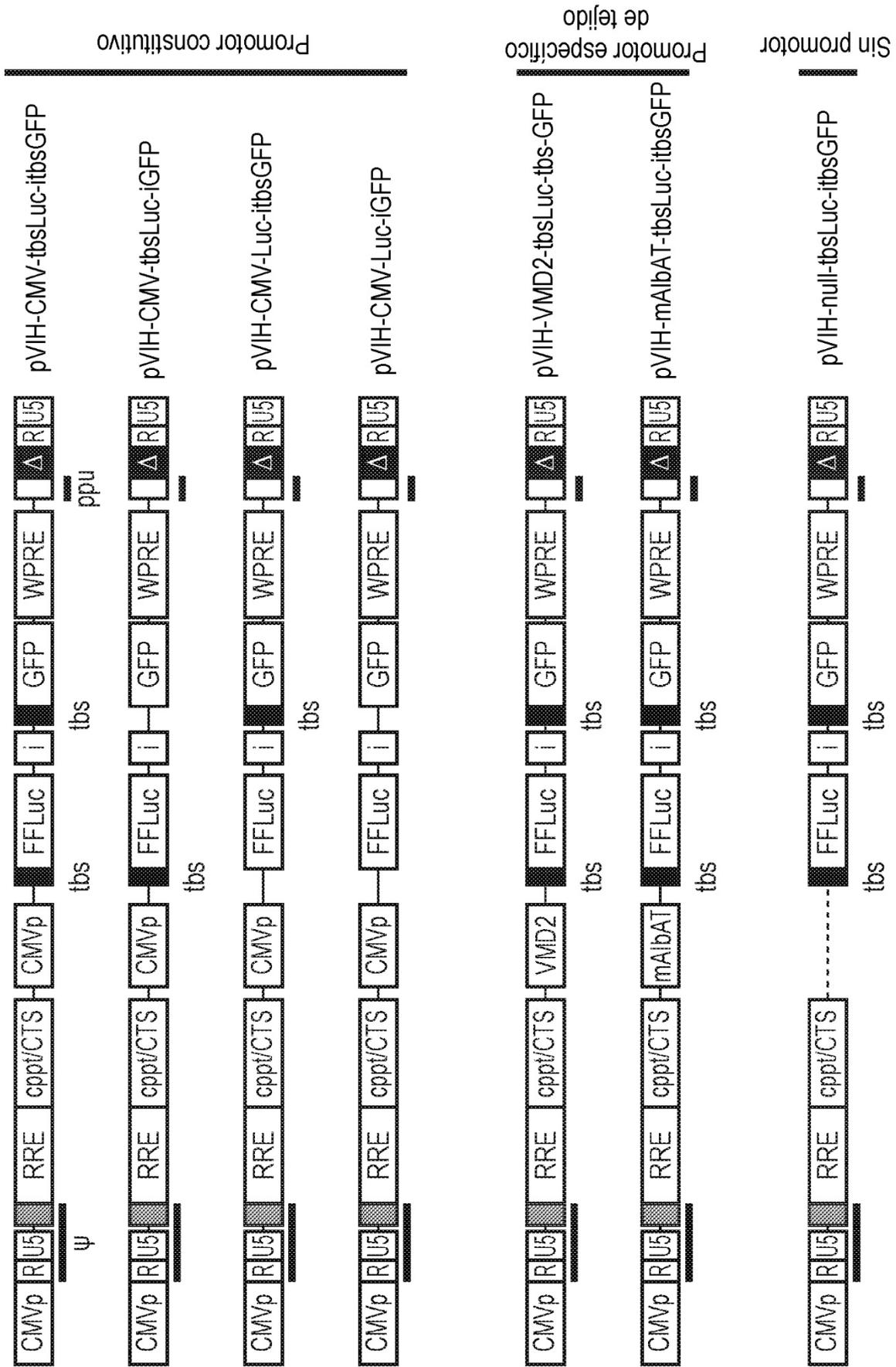
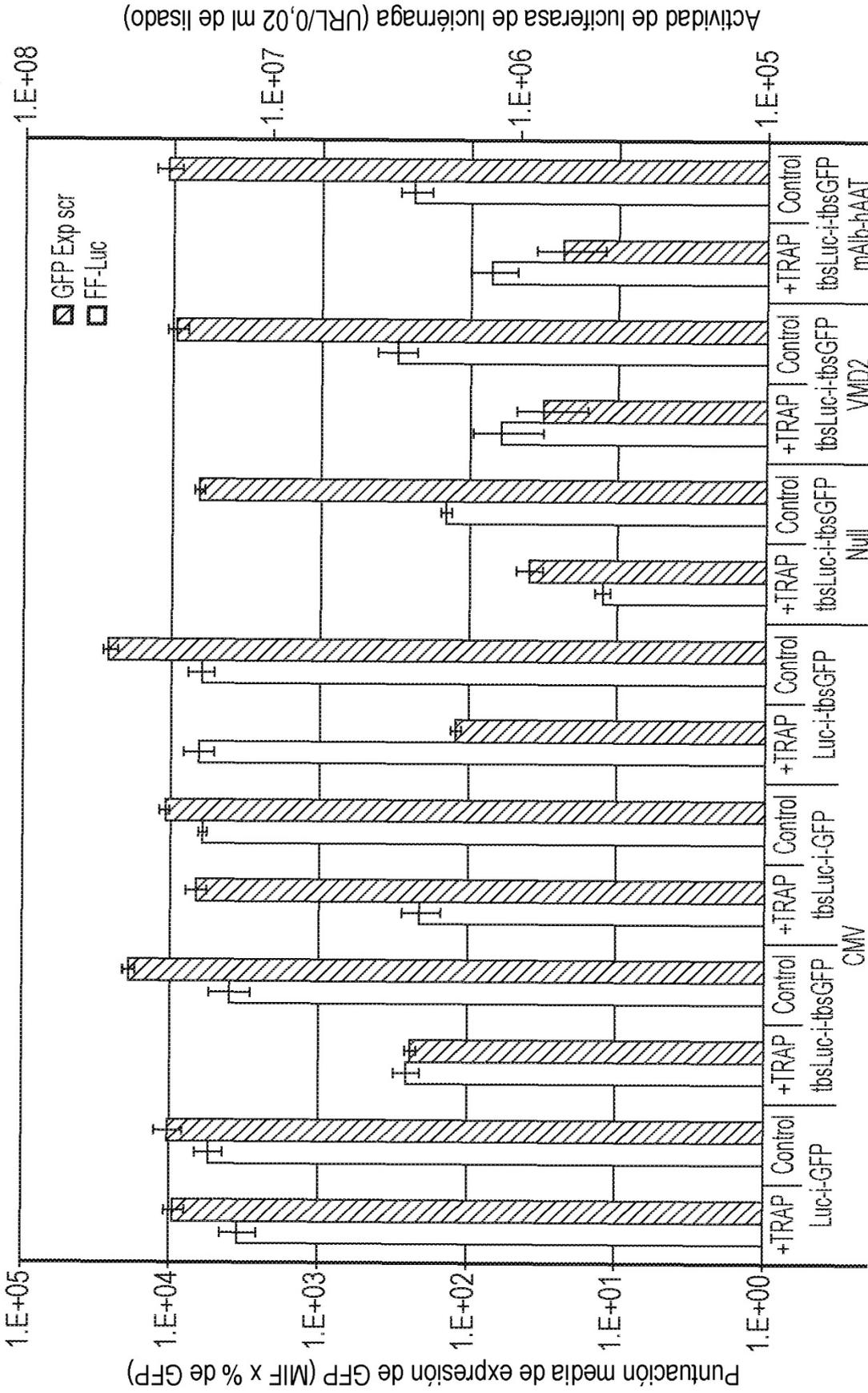


FIG. 27i

Represión simultánea de genes bicistrónicos en genomas de vector basado en VIH-1 durante la producción con el sistema TRIP



Genoma de vector VIH-1 bicistrónico (promotor y configuración bicistrónica según la figura 27i)

FIG. 27ii

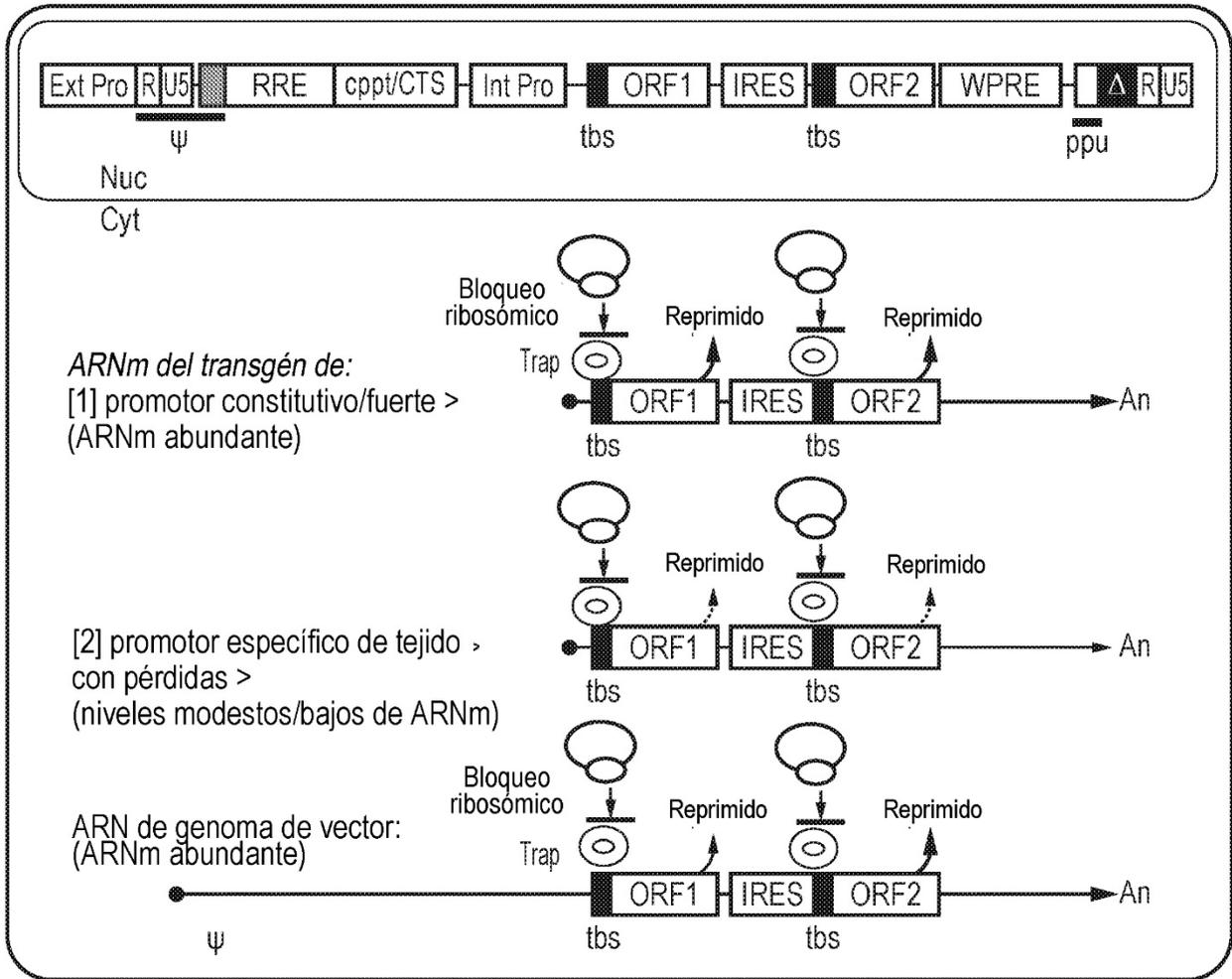


FIG. 27iii

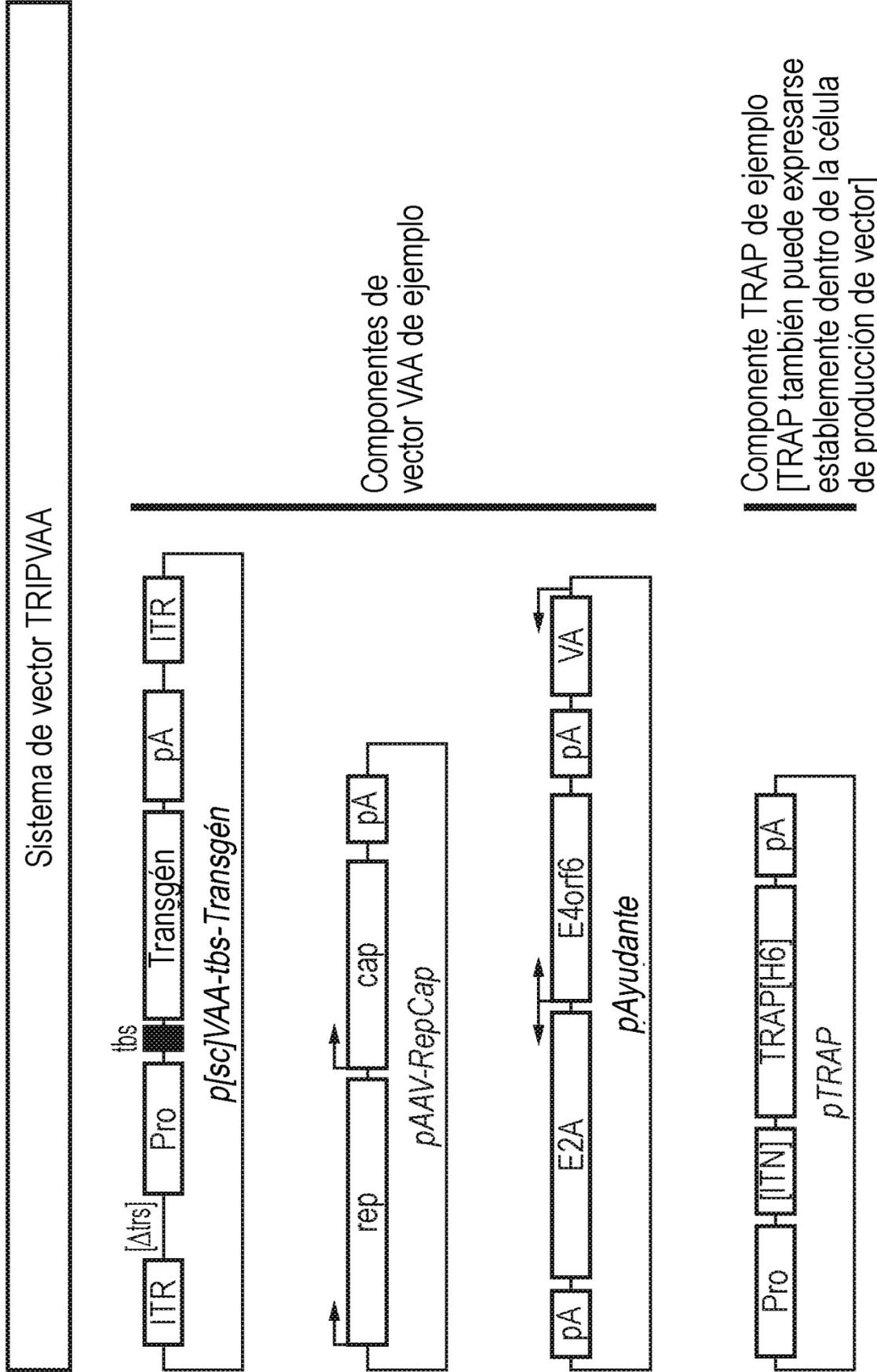
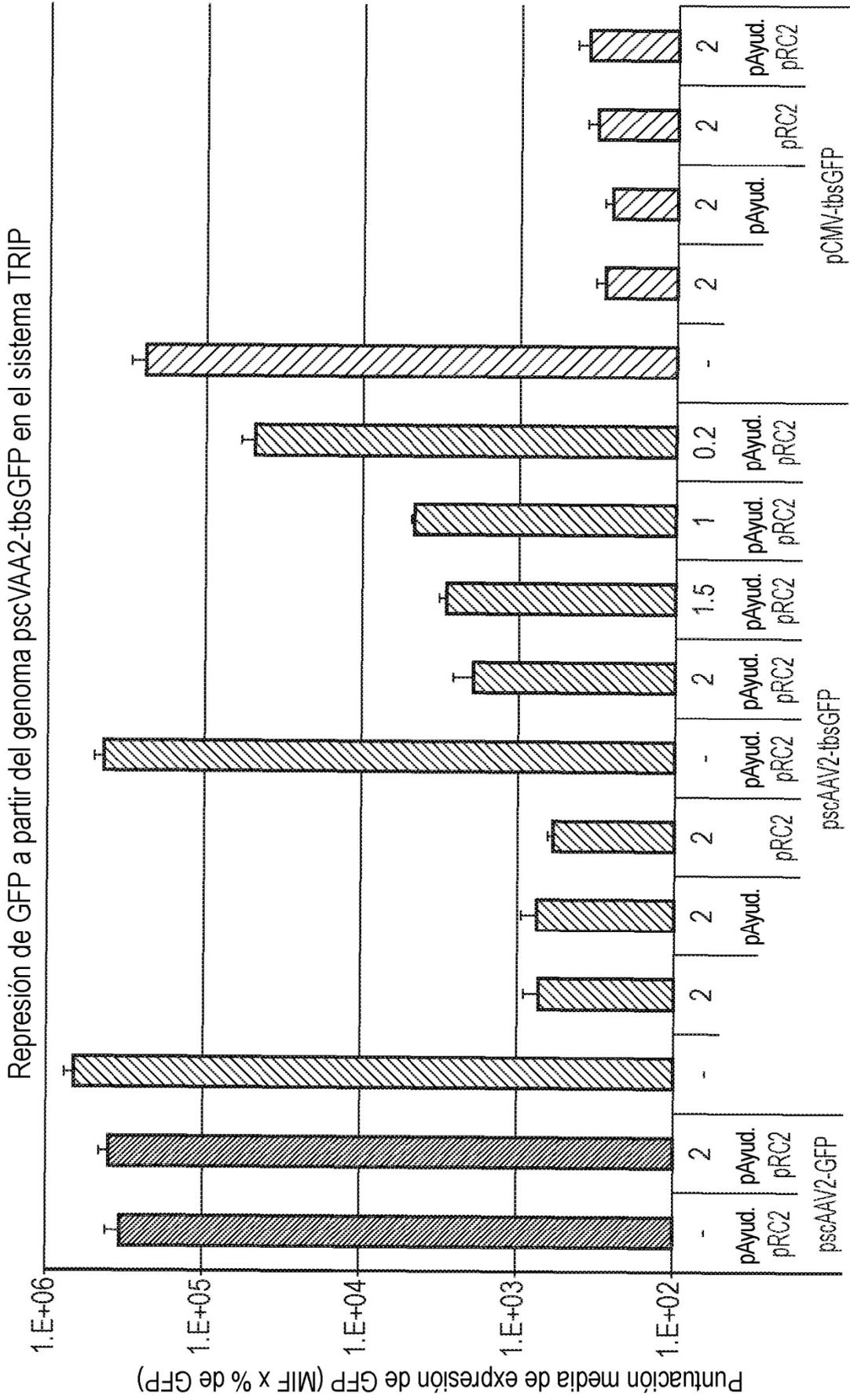


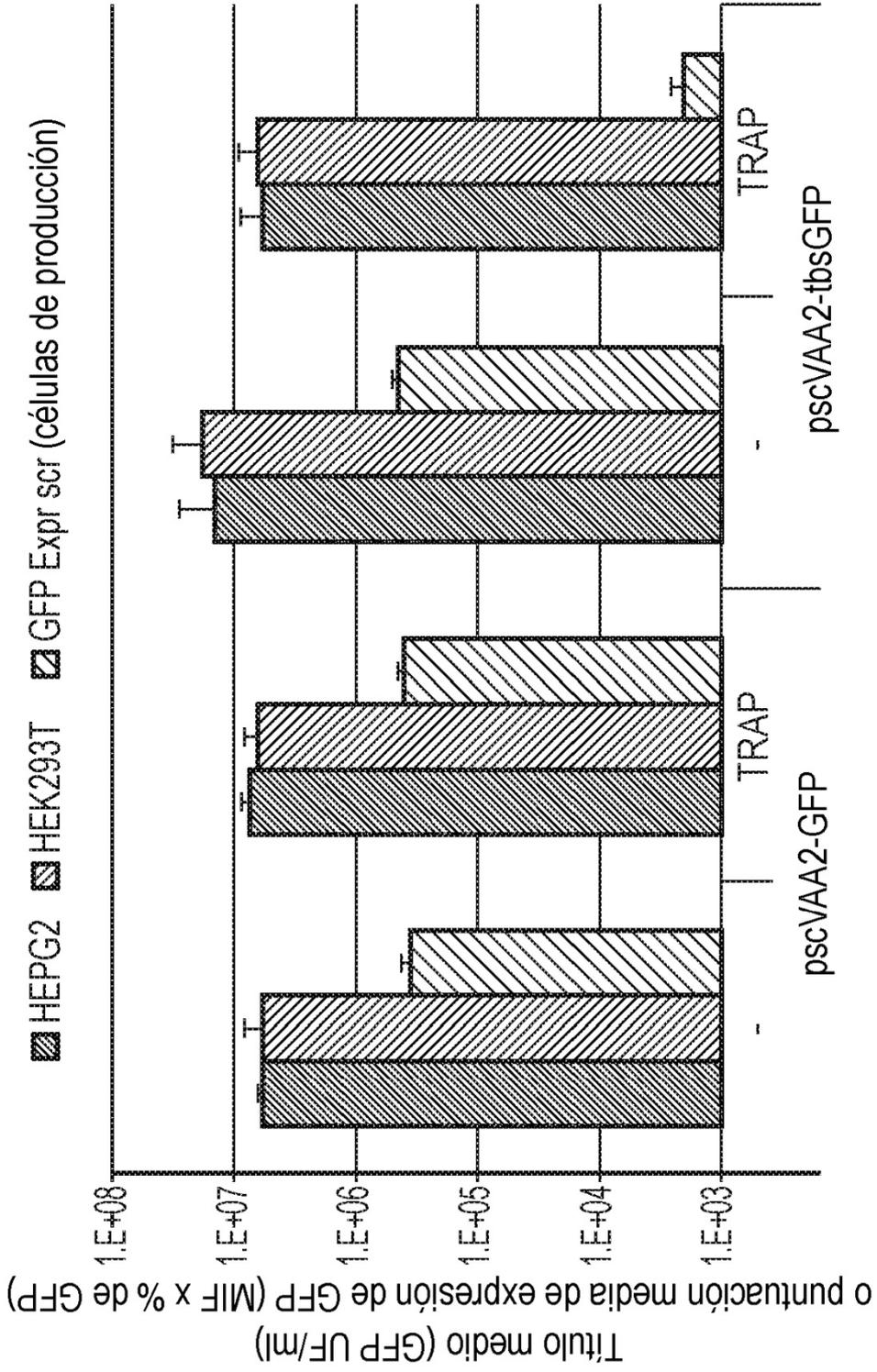
FIG. 28i



Plásmidos cotransfectados
 tbs-GFP | pRepCap2 | pAyudante, todos a razón de 2 µg por placa; los números indican masa de pEF1a-co-TRAP[H6]

FIG. 28ii

Producción de vectores scVAA2-GFP: comparación de títulos producidos por el sistema estándar versus TRIPVAA



Genoma de vector producido en células HEK293T +/- pEF1a-coTRAP[H6]

FIG. 28iii

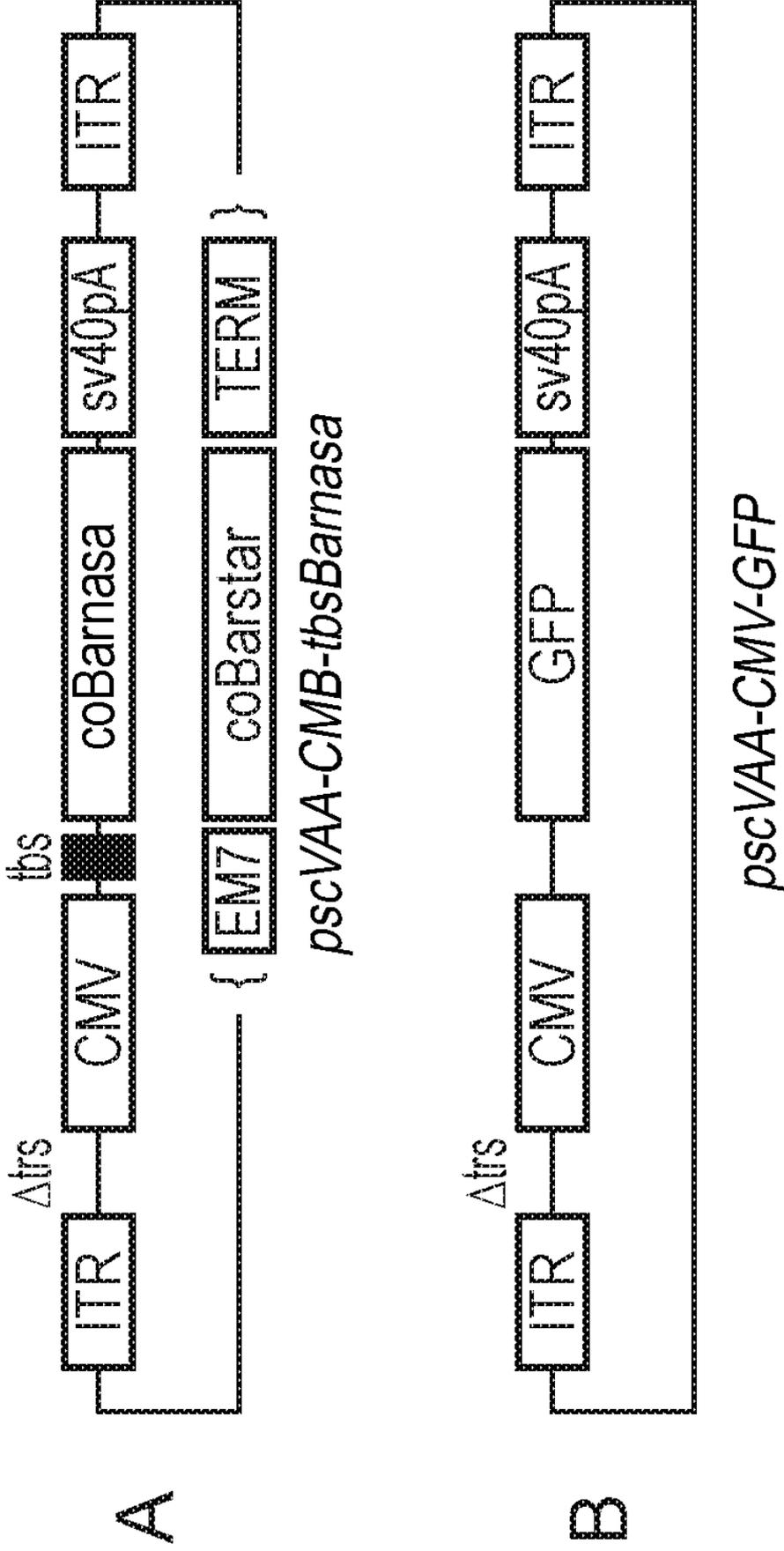


FIG. 28iv

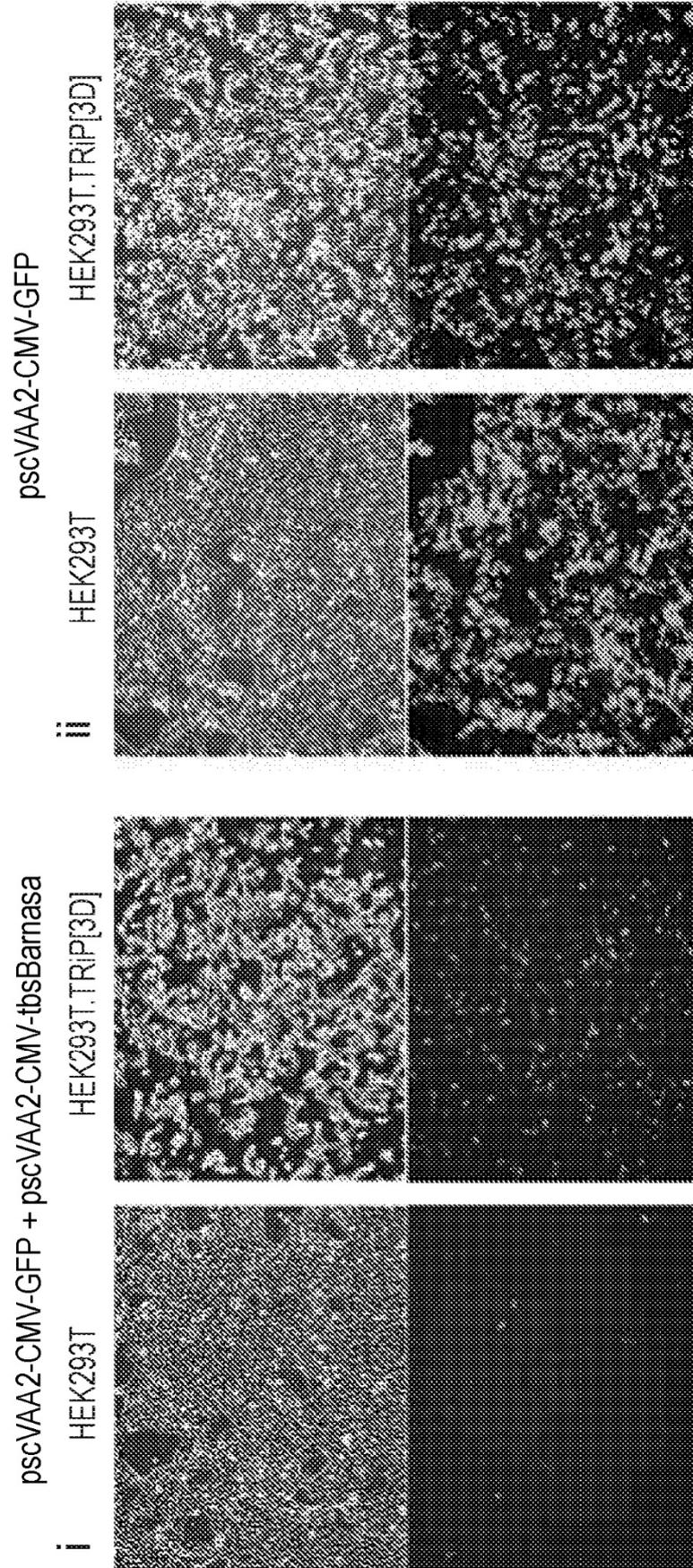


FIG. 28v

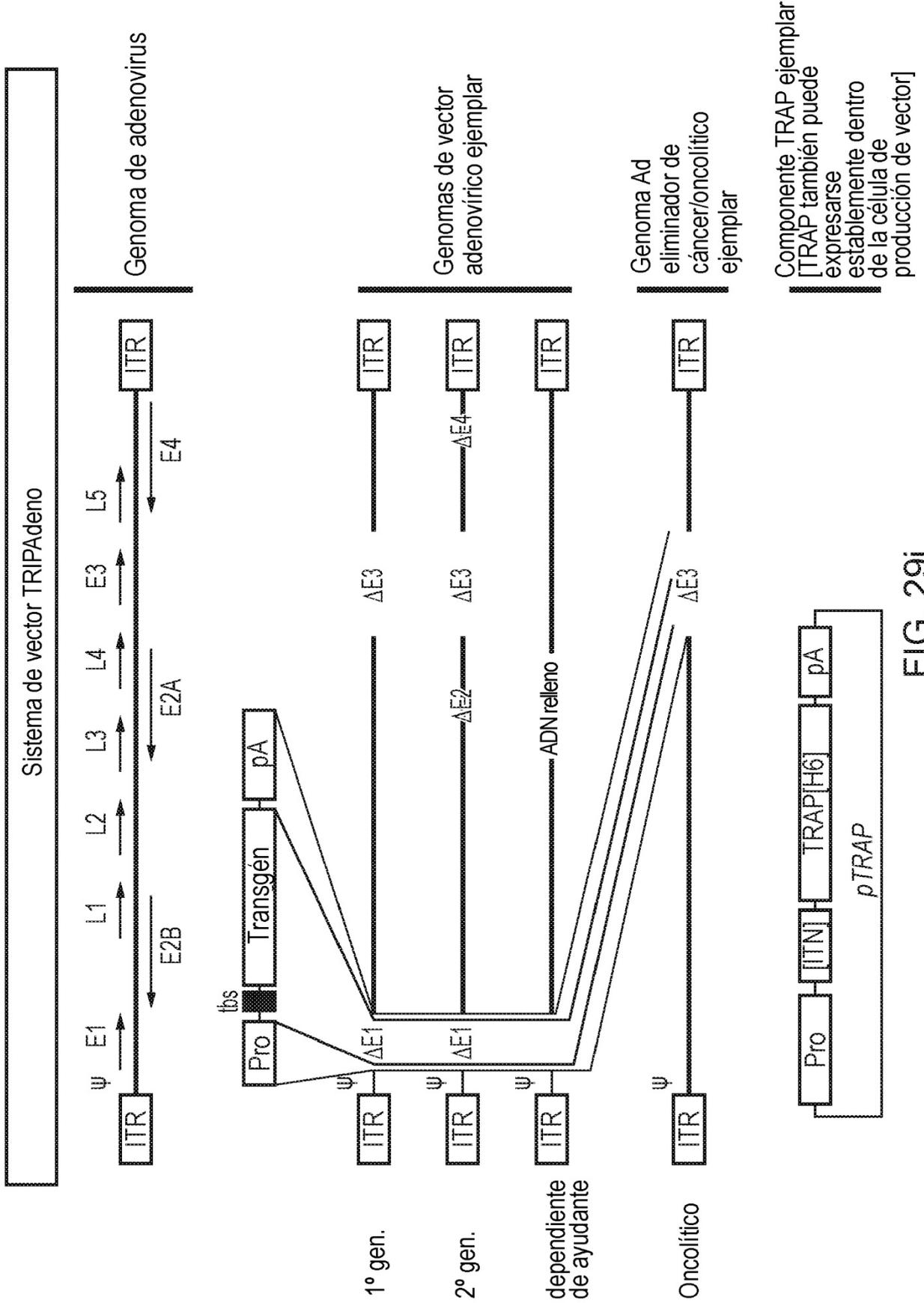


FIG. 29i

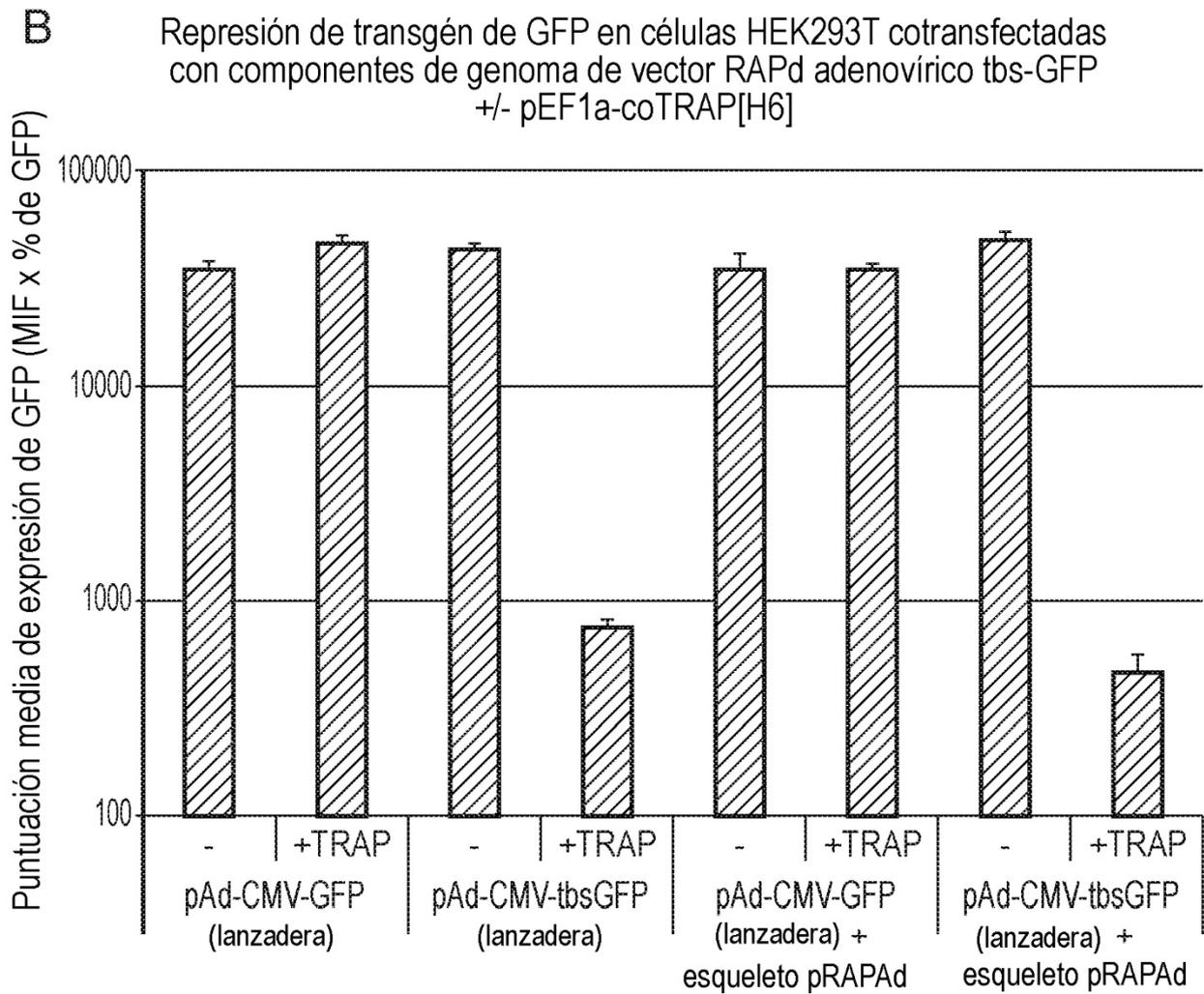
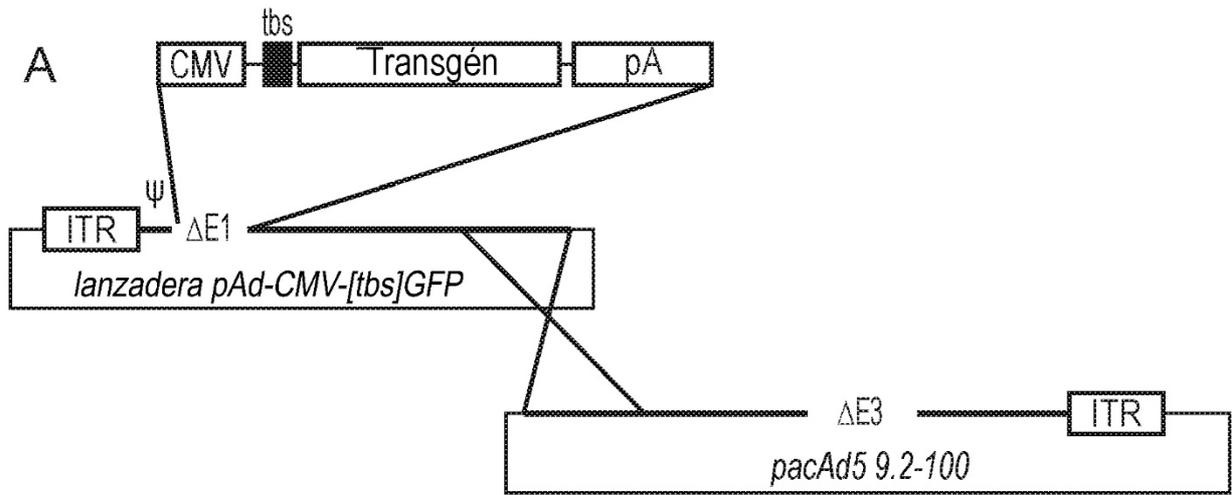
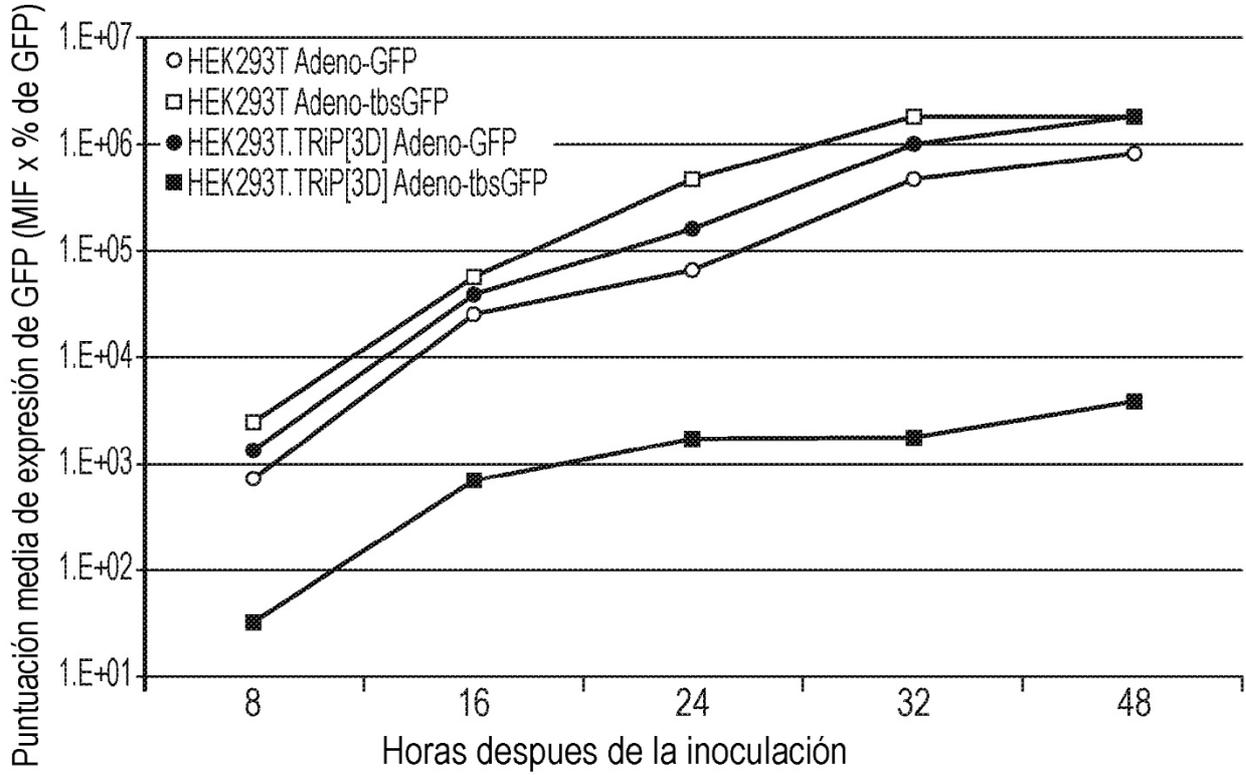


FIG. 29ii

A Expresión de transgén durante la amplificación de Adeno-CMV-GFP o Adeno-CMV-tbsGFP en células HEK293T o HEK293T.TRIP[3D] (expresantes de TRAP[H6])



B Títulos de vector adenovirico (células HeLa) de vectores producidos en células HEK293T o HEK293T.TRIP[3D] (expresantes de TRAP)

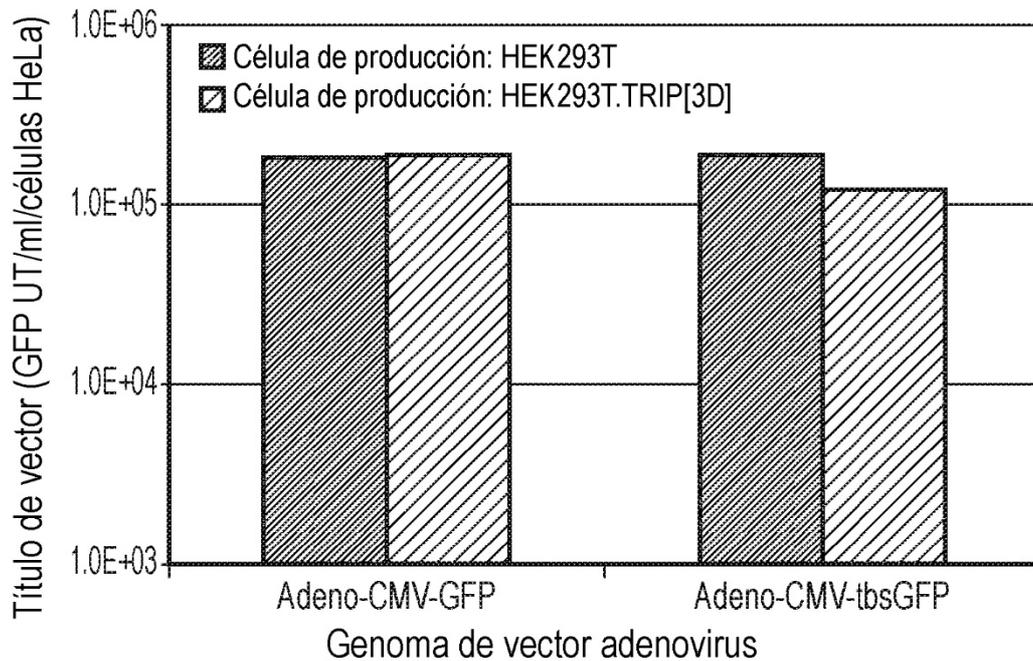


FIG. 29iii