

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 784 351**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.05.2016 PCT/US2016/032767**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.11.2016 WO16187151**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.05.2016 E 16729099 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.03.2020 EP 3283658**

54 Título: **Métodos de discriminación entre el VIH-1 y vectores de lentivíricos**

30 Prioridad:

18.05.2015 US 201562163327 P

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

24.09.2020

73 Titular/es:

**CALIMMUNE INC. (25.0%)
5151 E. Broadway Boulevard Suite 700
Tucson, Arizona 85711, US;
CALIMMUNE AUSTRALIA PTY LTD (25.0%);
ST. VINCENT'S HOSPITAL SYDNEY (25.0%) y
NEWSOUTH INNOVATIONS PTY LIMITED (25.0%)**

72 Inventor/es:

**SUZUKI, KAZUO;
KELLEHER, ANTHONY DOMINIC y
SYMONDS, GEOFFREY PHILLIP**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 784 351 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

Métodos de discriminación entre el VIH-1 y vectores de lentivíricos

5 **Campo de divulgación**

La presente divulgación se refiere en general a los campos de la biología molecular y la virología. En particular, la divulgación se refiere a métodos para discriminar entre el VIH-1 y vectores lentivíricos.

10 **Declaración de aplicabilidad industrial**

La presente divulgación tiene aplicabilidad industrial en el campo de las terapias génicas y el diagnóstico médico.

Antecedentes de la divulgación

15 El VIH-1 es el agente causal del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) en un orden de 30 millones de personas infectadas en todo el mundo. El VIH provoca que el sistema inmunitario falle y aumente la probabilidad de muerte debido a infecciones oportunistas. La infección por VIH es un importante problema sanitario mundial, como lo demuestra su designación como pandemia por la Organización Mundial de la Salud. La mayoría de las personas infectadas con VIH, en particular en el mundo en desarrollo, con el tiempo desarrollan SIDA, el cual se cobra la vida de más de un millón de personas cada año.

25 El VIH-1 pertenece a la familia de virus *Retroviridae*, y es un virus envuelto cuyo genoma consiste en dos moléculas de ARN monocatenario (ARNmc). La diana principal del VIH-1 son las células que expresan CD4+, tales como los linfocitos T CD4+. La glucoproteína del virus VIH-1 interactúa con la molécula CD4 de las células diana y con correceptores de quimiocinas, CCR5 o CXCR4, en la superficie de las células diana. Después de la fusión y la entrada en la célula diana, la nucleocápside que contiene el genoma vírico se disocia, liberando el contenido del virus, incluyendo el ARNmc, en el citoplasma. Una enzima transcriptasa inversa (RT, forma sigla de *reverse transcriptase*) del VIH-1 sintetiza ADN vírico bicatenario (ADNbc) a partir del genoma de ARNmc. Después de la síntesis de la molécula de ADN bicatenaria del VIH-1, el ADN del VIH-1 se integra en el genoma del hospedador.

35 El ADN del VIH-1 integrado está flanqueado por secuencias de repetición largas terminales (LTR, forma siglada de *long terminal repeat*) 5' y 3' idénticas a partir de las cuales el VIH-1 puede iniciar la transcripción del genoma del VIH-1 integrado. La transcripción del ADN vírico precisa factores de transcripción, tales como NF-κB, que están regulados al alza en los linfocitos T activados. Como consecuencia, la transcripción vírica es más activa en el linfocito T después de la activación del linfocito T, tal como durante la infección. El ARN vírico resultante de la transcripción del genoma del VIH-1 integrado se traduce posteriormente y se empaqueta en partículas de virus que luego salen de la célula para convertirse en virus infeccioso.

40 La terapia para la infección por VIH-1 incluye una terapia antirretrovírica combinada (cART, forma siglada de *combination antiretroviral therapy*). cART, que incluye combinaciones de inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos, inhibidores de la proteasa, inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleósidos, inhibidores de la integrasa y de la fusión, ralentiza la progresión del VIH. Esto, a su vez, disminuye drásticamente la tasa de morbilidad y mortalidad por VIH/SIDA en las regiones del mundo donde la terapia está disponible. Sin embargo, cART no cura ni elimina por completo todos los síntomas del VIH/SIDA. Además, la terapia cART puede verse comprometida por mutaciones resistentes a fármacos y tiene una gama de efectos secundarios que pueden ser graves y que parecen ser acumulativos. Adicionalmente, la interrupción de la terapia cART conduce casi invariablemente a la reaparición de la replicación vírica detectable y la progresión al SIDA, y se ha demostrado que está asociada con una mayor incidencia de todas las causas de mortalidad y sucesos graves no relacionados con el SIDA. Por estas razones, así como por el alto costo de la cART y la necesidad de una estricta adhesión al tratamiento, dicha terapia puede ser relativamente ineficaz para un gran número de pacientes.

55 Los vectores lentivíricos basados en el VIH se están convirtiendo rápidamente en el sistema de vectores de retrovirus de elección para la investigación y las aplicaciones clínicas de transferencia génica. La capacidad potenciada de los vectores lentivíricos para transducir tanto células madre en reposo como células totalmente diferenciadas que no están en división ha conducido al desarrollo de una amplia gama de vectores terapéuticos para el suministro de genes, así como herramientas de investigación prometedoras, tal como bibliotecas de atenuación génica de ARN horquillado corto (RNAhc) y vectores para la inducción de pluripotencia en células diferenciadas. Los primeros vectores de terapia génica clínica gammaretrovíricos restablecieron la función inmunitaria en pacientes con inmunodeficiencia combinada grave ligada a X (IDCG-X1), pero posteriormente se descubrió que provocaban trastornos proliferativos a través de la transactivación de protooncogenes. Los diseños de vectores lentivíricos más nuevos pueden reducir significativamente ese riesgo, y esperan pruebas clínicas para la validación final de su seguridad prevista. El campo sigue cambiando y los resultados de las pruebas clínicas son impredecibles.

65 Cuando la terapia génica basada en lentivirus anti-VIH-1 (por ejemplo, un vector lentivírico anti-VIH-1 de combinación doble (Cal-1, LVsh5/C46)) se utiliza para inhibir la replicación del VIH-1, es esencial cuantificar las

células que contienen ADN de Cal-1 y las que contienen ADN de VIH de tipo silvestre. Esto es particularmente cierto para las células obtenidas de pacientes infectados con VIH-1. Nos enfrentamos a la dificultad de distinguir al VIH-1 de Cal-1 a nivel de ADN. Los ensayos actuales basados en PCR disponibles en el mercado no pueden distinguir entre el ADN integrado del VIH-1 y el ADN integrado transgénico de Cal-1. Se ha informado sobre un ensayo para identificar el ADN del VIH-1 (Burke BP, *et al.*: Mol Ther Nucleic Acids 2015, 4:e236) basado en PCR para la región pol, en que se utilizan cebadores para detectar secuencias de VIH-1 que no están presentes en los vectores lentivíricos. Además, hay un posible ensayo informado para la identificación de ADN transgénico de Cal-1 utilizando la región cebadora de C46, que no está presente en el VIH-1 (Wolstein O, *et al.*: Mol Ther Methods & Clinical Development 2014, 1, 11).

Sumario de la divulgación

Un aspecto de la presente divulgación es una composición que comprende (a) una sonda que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 80 % de identidad con la de la SEQ ID NO: 14, estando la sonda conjugada con una fracción indicadora; (b) un cebador directo que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 90 % de identidad con la de SEQ ID NO: 2; y (c) un cebador inverso que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 80 % de identidad con la de SEQ ID NO: 6; donde cada uno de los cebadores directo e inverso son capaces de aparearse con una secuencia diana para amplificar la secuencia diana.

Otro aspecto de la presente divulgación es una composición que comprende (a) una sonda que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 80 % de identidad con la de la SEQ ID NO: 10; estando la sonda conjugada con una fracción indicadora; (b) un cebador directo que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 90 % de identidad con la de SEQ ID NO: 2; y (c) un cebador inverso que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 80 % de identidad con la de SEQ ID NO: 6; donde cada uno de los cebadores directo e inverso son capaces de aparearse con una secuencia diana para amplificar la secuencia diana.

Otro aspecto de la presente divulgación es una composición que comprende (a) una sonda que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 80 % de identidad con la de la SEQ ID NO: 8, estando la sonda conjugada con una fracción indicadora; (b) un cebador directo que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 90 % de identidad con la de SEQ ID NO: 4; y (c) un cebador inverso que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 80 % de identidad con la de SEQ ID NO: 6; donde cada uno de los cebadores directo e inverso son capaces de aparearse con una secuencia diana para amplificar la secuencia diana.

Otro aspecto de la presente descripción es un kit que comprende una primera composición y una segunda composición, donde la primera composición comprende (a) una sonda que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 80 % de identidad con la de la SEQ ID NO: 14, estando la sonda conjugada con una fracción indicadora; (b) un cebador directo que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 90 % de identidad con la de SEQ ID NO: 2; y (c) un cebador inverso que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 80 % de identidad con la de SEQ ID NO: 6; donde cada uno de los cebadores directo e inverso son capaces de aparearse con una secuencia diana para amplificar la secuencia diana; y la segunda composición comprende uno de (i) una composición que comprende (a) una sonda que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 80 % de identidad con la de la SEQ ID NO: 10; estando la sonda conjugada con una fracción indicadora; (b) un cebador directo que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 90 % de identidad con la de SEQ ID NO: 2; y (c) un cebador inverso que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 80 % de identidad con la de SEQ ID NO: 6; donde cada uno de los cebadores directo e inverso son capaces de aparearse con una secuencia diana para amplificar la secuencia diana; o (ii) una composición que comprende (a) una sonda que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 80 % de identidad con la de la SEQ ID NO: 8, estando la sonda conjugada con una fracción indicadora; (b) un cebador directo que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 90 % de identidad con la de SEQ ID NO: 4; y (c) un cebador inverso que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 80 % de identidad con la de SEQ ID NO: 6; donde cada uno de los cebadores directo e inverso son capaces de aparearse con una secuencia diana para amplificar la secuencia diana.

Otro aspecto de la presente divulgación es un método de cuantificación de una primera secuencia diana, que comprende poner en contacto una primera muestra que comprende la primera secuencia diana con una composición que comprende (a) una sonda que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 80 % de identidad con la de la SEQ ID NO: 14, estando la sonda conjugada con una fracción indicadora; (b) un cebador directo que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 90 % de identidad con la de SEQ ID NO: 2; y (c) un cebador inverso que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 80 % de identidad con la de SEQ ID NO: 6; realizar una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real utilizando la primera secuencia diana como molde; y cuantificar una cantidad de un primer amplicón generado.

En algunas realizaciones, el método comprende adicionalmente cuantificar una segunda secuencia diana dentro de una segunda muestra. En algunas realizaciones, la segunda secuencia diana se detecta utilizando una composición que comprende (a) una sonda que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 80 % de identidad con la de la SEQ ID NO: 10; estando la sonda conjugada con una fracción indicadora; (b) un cebador

directo que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 90 % de identidad con la de SEQ ID NO: 2; y (c) un cebador inverso que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 80 % de identidad con la de SEQ ID NO: 6; donde cada uno de los cebadores directo e inverso son capaces de aparearse con una secuencia diana para amplificar la secuencia diana. En otras realizaciones, la segunda secuencia diana se cuantifica
 5 utilizando una composición que comprende (a) una sonda que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 80 % de identidad con la de la SEQ ID NO: 8, estando la sonda conjugada con una fracción indicadora; (b) un cebador directo que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 90 % de identidad con la de SEQ ID NO: 4; y (c) un cebador inverso que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 80 % de
 10 identidad con la de SEQ ID NO: 6; donde cada uno de los cebadores directo e inverso son capaces de aparearse con una secuencia diana para amplificar la secuencia diana.

En algunas realizaciones, la primera y la segunda muestras se obtienen de la misma fuente, y donde la cuantificación de la primera y segunda secuencias diana tiene lugar en una única cámara de reacción. En algunas realizaciones, la primera y la segunda muestras se obtienen de la misma fuente, y donde la cuantificación de la
 15 primera y segunda secuencias diana tiene lugar en cámaras de reacción distintas. En algunas realizaciones, la primera secuencia diana es una secuencia de ácido nucleico lentivírico, y donde la segunda secuencia diana es una secuencia de ácido nucleico de VIH. En algunas realizaciones, la etapa de cuantificar la cantidad del primer amplicón generado comprende detectar señales procedentes de una primera fracción indicadora; y donde la etapa de
 20 cuantificar la cantidad del segundo amplicón generado comprende detectar señales procedentes de una segunda fracción indicadora, donde las primera y segunda fracciones indicadoras son distintas. En algunas realizaciones, el método comprende adicionalmente evaluar la eficacia de la transferencia génica desde un vector lentivírico comparando (i) una primera relación de la cantidad cuantificada del primer amplicón generado con la cantidad
 25 cuantificada del segundo amplicón generado en un primer punto de tiempo; (ii) con una segunda relación de la cantidad cuantificada del primer amplicón generado con la cantidad cuantificada del segundo amplicón generado en un segundo punto de tiempo. En algunas realizaciones, una relación creciente de ácido nucleico lentivírico con respecto a ácido nucleico de VIH es indicativa de eficacia terapéutica.

Otro aspecto de la presente divulgación es un método para la detección de un ácido nucleico lentivírico y/o un ácido nucleico de VIH en una muestra, comprendiendo el método: (a) realizar una PCR en tiempo real múltiple con un
 30 molde de ácido nucleico lentivírico y un molde de ácido nucleico de VIH en la muestra utilizando: (i) un primer cebador directo que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 90 % de identidad con la de la SEQ ID NO: 2, un primer cebador inverso que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 90 % de identidad con la de la SEQ ID NO: 6, y una primera sonda que tiene una secuencia de nucleótidos con al menos el 90 % de
 35 identidad con la de la SEQ ID NO: 14, teniendo la primera sonda una primera fracción indicadora; (ii) un segundo cebador directo que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 90 % de identidad con la de la SEQ ID NO: 2, un segundo cebador inverso que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 90 % de identidad con la de la SEQ ID NO: 6, y una segunda sonda que tiene una secuencia de nucleótidos con al menos el 90 % de
 40 identidad con la de la SEQ ID NO: 10, teniendo la segunda sonda una segunda fracción indicadora, en que las primera y segunda fracciones indicadoras son distintas; (b) detectar un amplicón generado por (i) los primeros cebadores directo e inverso, y (ii) los segundos cebadores directo e inverso; y donde la detección comprende detectar las primera y segunda señales a partir de las primera y segunda fracciones indicadoras.

Otro aspecto de la presente divulgación es un método para la detección de un ácido nucleico lentivírico y/o un ácido nucleico de VIH en una muestra, comprendiendo el método: (a) realizar una PCR en tiempo real múltiple con un
 45 molde de ácido nucleico lentivírico y un molde de ácido nucleico de VIH en la muestra utilizando: (i) un primer cebador directo que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 90 % de identidad con la de la SEQ ID NO: 2, un primer cebador inverso que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 90 % de identidad con la de la SEQ ID NO: 6, y una primera sonda que tiene una secuencia de nucleótidos con al menos el 90 % de
 50 identidad con la de la SEQ ID NO: 14, teniendo la primera sonda una primera fracción indicadora; (ii) un segundo cebador directo que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 90 % de identidad con la de la SEQ ID NO: 4, un segundo cebador inverso que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 90 % de identidad con la de la SEQ ID NO: 6, y una segunda sonda que tiene una secuencia de nucleótidos con al menos el 90 % de
 55 identidad con la de la SEQ ID NO: 8, teniendo la segunda sonda una segunda fracción indicadora, en que las primera y segunda fracciones indicadoras son distintas; (b) detectar un amplicón generado por (i) los primeros cebadores directo e inverso, y (ii) los segundos cebadores directo e inverso; y donde la detección comprende detectar las primera y segunda señales a partir de las primera y segunda fracciones indicadoras.

Otro aspecto es un método de detección de una cantidad de un ácido nucleico lentivírico en una muestra, que comprende: (a) poner en contacto la muestra con un primer cebador directo y un primer cebador inverso; (b) poner
 60 en contacto la muestra con una sonda de unión específica para un sitio de unión dentro de la 3' LTR del ácido nucleico lentivírico, donde la sonda de unión comprende una primera porción que es capaz de hibridar con al menos una porción de una secuencia dentro de la región U3 de la 3'LTR del ácido nucleico lentivírico y una segunda porción que es capaz de hibridar con al menos una porción de una secuencia dentro de la región R de la 3'LTR del
 65 ácido nucleico lentivírico, y donde la sonda de unión comprende una primera fracción detectable; y detectar señales procedentes de la primera fracción detectable. En algunas realizaciones, la primera porción de la sonda de unión hibrida con una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 80 % de identidad con la de la SEQ ID NO: 12. En

algunas realizaciones, la segunda porción de la sonda de unión híbrida con una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 13. En algunas realizaciones, la sonda de unión comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 80 % de identidad con la de la SEQ ID NO: 14. En algunas realizaciones, la sonda de unión comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 90 % de identidad con la de la SEQ ID NO: 14.

5 En algunas realizaciones, el método comprende adicionalmente detectar una cantidad de un ácido nucleico de VIH en la muestra. En algunas realizaciones, la detección de la cantidad de ácido nucleico lentivírico y la cantidad de ácido nucleico de VIH en la muestra tiene lugar en el mismo tubo de reacción. En algunas realizaciones, la detección de la cantidad de ácido nucleico de VIH comprende poner en contacto la muestra con una segunda sonda específica para una secuencia de la caja TATA dentro de una 3'LTR de una secuencia de ácido nucleico de VIH, estando la
10 segunda sonda conjugada con una segunda fracción detectable; y detectar señales procedentes de la segunda fracción detectable. En algunas realizaciones, la segunda sonda tiene una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 90 % de identidad con la de la SEQ ID NO: 10. En algunas realizaciones, el primer cebador directo es un cebador NuAf y el primer cebador inverso es un cebador LTR-rev. En algunas realizaciones, el cebador NuAf tiene la
15 secuencia de la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, el cebador LTR-rev tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 6.

En algunas realizaciones, la detección de la cantidad de ácido nucleico lentivírico y la cantidad de ácido nucleico de VIH en la muestra tiene lugar en distintos tubos de reacción. En algunas realizaciones, la detección de la cantidad de ácido nucleico de VIH comprende poner en contacto la muestra con un segundo cebador directo, un segundo
20 cebador inverso y una segunda sonda que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 90 % de identidad con la de la SEQ ID NO: 8, donde la segunda sonda comprende una segunda fracción detectable; y detectar señales procedentes de la segunda fracción detectable. En algunas realizaciones, el segundo cebador directo híbrida una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, el segundo cebador directo comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 80 % de identidad con la de la SEQ ID NO:
25 4. En algunas realizaciones, el segundo cebador inverso comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 6.

Otro aspecto de la presente divulgación es un método para la detección de un ácido nucleico lentivírico en una muestra, que comprende: (a) poner en contacto la muestra con un primer cebador directo y un primer cebador inverso; (b) poner en contacto la muestra con una sonda de unión específica para un sitio de unión dentro de una 3'
30 LTR del ácido nucleico lentivírico, donde la 3'LTR del ácido nucleico lentivírico no comprende una secuencia de la caja TATA, y donde el sitio de unión abarca una porción de la región U3 de la 3'LTR del ácido nucleico lentivírico y una porción de la región R de la 3'LTR del ácido nucleico lentivírico, y donde al menos una porción de la sonda de unión híbrida con una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 13. En algunas realizaciones, el método
35 comprende adicionalmente poner en contacto la muestra con una segunda sonda específica para una secuencia de la caja TATA dentro de una 3'LTR de una secuencia de ácido nucleico de VIH, teniendo la segunda sonda una segunda fracción detectable, donde las primera y segunda fracciones detectables son distintas, y detectan señales procedentes de la segunda fracción detectable. En algunas realizaciones, el método comprende adicionalmente
40 poner en contacto la muestra con un segundo cebador directo, un segundo cebador inverso y una segunda sonda que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 80 % de identidad con la de la SEQ ID NO: 8, donde la segunda sonda comprende una segunda fracción detectable, donde las primera y segunda fracciones detectables son distintas; y detectar señales procedentes de la segunda fracción detectable.

Otro aspecto de la presente divulgación es un método de cuantificación de una cantidad de un ácido nucleico lentivírico y una cantidad de un ácido nucleico de VIH en una muestra, comprendiendo el ácido nucleico lentivírico y
45 el ácido nucleico de VIH distintas 3'LTR, comprendiendo el método amplificar tanto el ácido nucleico lentivírico como el ácido nucleico de VIH con un cebador directo que híbrida con una secuencia dentro tanto de la 3'LTR del ácido nucleico lentivírico como de la 3'LTR del ácido nucleico de VIH, y un cebador inverso que híbrida con una secuencia dentro tanto de la 3'LTR del ácido nucleico lentivírico como de la 3'LTR del ácido nucleico de VIH, y donde la
50 amplificación tanto del ácido nucleico lentivírico como del ácido nucleico de VIH tiene lugar en un único tubo de reacción. En algunas realizaciones, la 3'LTR del ácido nucleico lentivírico comprende al menos 50 nucleótidos menos que la 3'LTR del ácido nucleico de VIH. En algunas realizaciones, la 3'LTR del ácido nucleico lentivírico no comprende una secuencia de caja TATA. En algunas realizaciones, la amplificación produce un amplicón de ácido nucleico lentivírico que tiene un primer tamaño y un amplicón de ácido nucleico de VIH que tiene un segundo tamaño, donde el amplicón del ácido nucleico lentivírico es más pequeño que el amplicón del ácido nucleico de VIH.
55 En algunas realizaciones, se utiliza una separación electroforética para separar el amplicón del ácido nucleico lentivírico y el amplicón del ácido nucleico de VIH. En algunas realizaciones, la 3'LTR del ácido nucleico lentivírico comprende una región U3 que tiene una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 15. En algunas realizaciones, la 3'LTR del ácido nucleico de VIH comprende una región U3 que tiene una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID
60 NO: 16.

Otro aspecto de la presente divulgación es un amplicón obtenible mediante amplificación a partir de una muestra que contiene ácido nucleico lentivírico con una pareja de cebadores, teniendo los cebadores la SEQ ID NO: 2 y la SEQ ID NO: 6, comprendiendo el amplicón una 3'LTR que no comprende una secuencia de la caja TATA.

65 Otro aspecto de la presente divulgación es una secuencia de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 90 % de identidad con la de la SEQ ID NO: 14.

Otro aspecto de la presente divulgación es una secuencia de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 90 % de identidad con la de la SEQ ID NO: 15.

- 5 Otro aspecto de la presente divulgación es una secuencia de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 70 % de identidad con la de la SEQ ID NO: 14 y es capaz de hibridar con un fragmento de una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 15.

- 10 Otro aspecto de la presente divulgación es una secuencia de ácido nucleico aislada que tiene una primera porción capaz de hibridar con una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 70 % de identidad con la de la SEQ ID NO: 12, y una segunda porción capaz de hibridar con una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 13.

- 15 Otro aspecto de la presente divulgación es un método para la cuantificación de una cantidad de un ácido nucleico lentivírico en una muestra, teniendo el ácido nucleico lentivírico deleciones en una 3'LTR en comparación con una 3'LTR de tipo silvestre, que comprende amplificar el ácido nucleico lentivírico utilizando una sonda específica para las deleciones en la 3'LTR del ácido nucleico lentivírico. En algunas realizaciones, la sonda específica para las deleciones en la 3'LTR del ácido nucleico lentivírico comprende una primera porción que hibrida con una secuencia dentro de una región U3 de la 3'LTR del ácido nucleico lentivírico y una segunda porción que hibrida con una secuencia dentro de una región R de la 3'LTR del ácido nucleico lentivírico. En algunas realizaciones, la secuencia dentro de la región U3 de la 3'LTR del ácido nucleico lentivírico comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en (i) una secuencia que tiene al menos el 90 % de identidad con la de la SEQ ID NO: 12; y (ii) la SEQ ID NO: 12. En algunas realizaciones, la secuencia dentro de la región R de la 3'LTR del vector lentivírico comprende la de la SEQ ID NO: 13. En algunas realizaciones, la sonda específica para las deleciones en la 3'LTR del ácido nucleico lentivírico comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en (i) una secuencia que tiene al menos el 90 % de identidad con la de la SEQ ID NO: 14; y (ii) la SEQ ID NO: 14.

- 25 En algunas realizaciones, la amplificación del ácido nucleico del vector lentivírico comprende adicionalmente la introducción de cebadores directos e inversos específicos para secuencias dentro de la 3'LTR del ácido nucleico del vector lentivírico. En algunas realizaciones, el cebador directo comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, el cebador inverso comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 4. En algunas realizaciones, el método comprende adicionalmente cuantificar una cantidad de un ácido nucleico de VIH de tipo silvestre en la muestra. En algunas realizaciones, la cuantificación de la cantidad de ácido nucleico de VIH presente en la muestra comprende amplificar el ácido nucleico de VIH de tipo silvestre, y donde la amplificación del ácido nucleico de VIH de tipo silvestre tiene lugar en el mismo tubo de reacción que la amplificación del ácido nucleico lentivírico. En algunas realizaciones, la amplificación del ácido nucleico de VIH utiliza una sonda específica para una secuencia de la caja TATA dentro de una región U3 de la 3'LTR del ácido nucleico de VIH de tipo silvestre. En algunas realizaciones, la amplificación del ácido nucleico de VIH comprende los mismos cebadores directo e inverso utilizados en la amplificación del ácido nucleico del vector lentivírico. En algunas realizaciones, la sonda específica para la 3'LTR del ácido nucleico del vector lentivírico y la sonda específica para la secuencia de la caja TATA dentro de la región U3 del ácido nucleico de VIH de tipo silvestre están conjugadas cada una con una fracción detectable distinta.

- 30 En algunas realizaciones, la amplificación del ácido nucleico de VIH de tipo silvestre presente en la muestra tiene lugar en un tubo de reacción distinto al de la amplificación del ácido nucleico del vector lentivírico. En algunas realizaciones, la amplificación del ácido nucleico de VIH de tipo silvestre utiliza una sonda específica para una secuencia dentro de una región R de la 3'LTR del ácido nucleico de VIH de tipo silvestre. En algunas realizaciones, la amplificación del ácido nucleico de VIH comprende el mismo cebador inverso que se usa en la amplificación del ácido nucleico del vector lentivírico. En algunas realizaciones, la amplificación del ácido nucleico de VIH de tipo silvestre comprende un cebador directo específico para una secuencia de la caja TATA dentro de una región U3 de la 3'LTR del ácido nucleico de VIH de tipo silvestre. En algunas realizaciones, la sonda específica para la 3'LTR del ácido nucleico del vector lentivírico y la sonda específica para una secuencia dentro de la región R del ácido nucleico de VIH de tipo silvestre están conjugadas cada una con una fracción detectable distinta.

- 35 Otro aspecto de la presente divulgación es un método para discriminar entre un ácido nucleico lentivírico y un ácido nucleico de VIH presente en una muestra, comprendiendo el ácido nucleico lentivírico una 3'LTR que tiene una región U3 que no contiene una secuencia de la caja TATA, que comprende amplificar el ácido nucleico lentivírico con una primera sonda específica para una secuencia dentro de la 3'LTR del ácido nucleico lentivírico y amplificar el ácido nucleico de VIH con una segunda sonda específica para una secuencia dentro de una 3'LTR del ácido nucleico de VIH.

60 Breve descripción de los dibujos

- 65 La Figura 1A es una representación esquemática del vector lentivírico LVsh5/C46, en que el ARNhc CCR5 (sh5) está bajo el promotor humano de la ARN polimerasa III de HI humana; y C46 está bajo el promotor de Ubiquitina C (UbC). Otros componentes del vector LVsh5/C46 incluyen repeticiones largas terminales (las LTR) 5'y 3' de VIH-1 modificadas, un tramo central de polipurina (cPPT, forma siglada de *central polypurine tract*) y un elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de marmota (WPRE, forma siglada de *woodchuck hepatitis*

virus posttranscriptional regulatory element). De forma notable, la caja TATA de la región U3 se eliminó en LVsh5/C46, como se describe adicionalmente en el presente documento, que lo distingue de una región U3 de tipo silvestre. Las Figuras 1B a 1I proporcionan los alineamientos entre la región U3 de la 3'LTR de un vector lentivírico particular, en concreto, Cal-1, y una región U3 de una 3'LTR de tipo silvestre, tal como el que se encuentra en el VIH-1 (HXB2). La Figura 1B ilustra que no hay una caja TATA en la región U3 de Cal-1, lo que indica una secuencia no coincidente entre la región U3 de Cal-1 y HXB2. Las secuencias no coincidentes se indican mediante puntos. La Figura 1C también ilustra la región R de la 3'LTR de Cal-1, en que la región R de Cal-1 y VIH tienen la misma secuencia. La Figura 1C ilustra un "sitio de unión" de Cal-1, el sitio de unión hace de puente entre una secuencia que estaría presente en una región U3 de tipo silvestre. La Figura 1C ilustra nuevamente las diferencias entre la región U3 de Cal-1 y una región U3 de tipo silvestre, tal como en el VIH. Las Figuras 1D a 1I ilustran adicionalmente la diferencia entre las regiones U3 de Cal-1 y VIH.

La Figura 2 ilustra un alineamiento de la región U3 de Cal-1 y de VIH-1 (HXB2) y la ubicación de los cebadores y las sondas, de acuerdo con un "Método 1" multiplexado como se divulga en el presente documento. De forma notable, la sonda marcada con Cy5 está diseñada para los sitios de unión exclusivos de las regiones U3 y R de la construcción Cal-1, que no está presente en el VIH-1; la sonda etiquetada con FAM sí está diseñada para la región de la caja TATA en VIH-1, que no está presente en el Cal-1.

La Figura 3 ilustra un alineamiento de la región U3 de Cal-1 y de VIH-1 (HXB2) y la ubicación de los cebadores y las sondas, de acuerdo con un "Método-2" de dos tubos como se divulga en el presente documento. De forma notable, el cebador directo (NUAf) y el cebador inverso (LTR-rev) pueden amplificar Cal-1; y la sonda marcada con Cy5 está diseñada para un sitio de unión exclusivo de las regiones U3 y R de la construcción Cal-1, que no está presente en el VIH-1. Asimismo, el cebador directo (TATA) y el cebador LTR-rev solo pueden amplificar el VIH-1; la sonda marcada con FAM puede amplificar secuencias de VIH.

La Figura 4 ilustra un alineamiento de la región U3 de Cal-1 y de VIH-1 (HXB2) y la ubicación de los cebadores y las sondas, de acuerdo con un método "Método 3" multiplexado como se divulga en el presente documento. De forma notable, el cebador directo (NUAf) y el cebador inverso (LTR-rev) tienen la capacidad de amplificar tanto a Cal-1 como a VIH-1. La banda amplificada por PCR de Cal-1 es más corta que la banda amplificada por PCR de VIH-1. La cuantificación de los amplicones de distintos tamaños permite la generación de datos relacionados con el número de copias de Cal-1 y VIH-1 dentro de la reacción.

Las Figuras 5A, 5B y 5C proporcionan gráficos que muestran los resultados de experimentos iniciales *in vitro* basados en células MOLT-4 transducidas con lenti-Cal-1 con una MOI de 2,5. La Figura 5A muestra datos de ensayos de transcriptasa inversa (RT). Las Figuras 5B y 5C muestran los resultados de cuantificación del número de copias del ARN de VIH-1 y el ARN de Cal-1 utilizando un ensayo de tubo único en conformidad con un Método 1 multiplexado descrito en el presente documento.

Las Figuras 6A, 6B y 6C proporcionan gráficos que muestran los resultados de experimentos que permiten la identificación el número de copias del ADN de VIH-1 y del ADN de Cal-1 utilizando un ensayo de tubo único en conformidad con un Método 1, como se describe en el presente documento. La Figura 7 ilustra los tamaños comparativos de amplicones de Cal-1 y VIH-1 utilizando un ensayo de tubo único en conformidad con el Método 3, como se describe en el presente documento.

Las Figuras 8A y 8B proporcionan gráficos que muestran los resultados de los experimentos que permiten la identificación del número de copias del ADN de VIH-1 y del ADN de Cal-1 utilizando ensayos de dos tubos distintos en conformidad con el Método 2, como se describe en el presente documento.

La Figura 9 proporciona gráficos que muestran los resultados de los experimentos que permiten la identificación del número de copias del ADN de VIH-1 utilizando ensayos de dos tubos distintos en conformidad con el Método 2, como se describe en el presente documento.

La Figura 10A proporciona un análisis de flujo de los segundos experimentos *in vitro* basados en células MOLT-4 transducidas con lenti-ccr5 y Cal-1 (ccr5 y C46). Las células MOLT-4 se transdujeron con lenti-sh5 y lenti-Cal-1 con una MOI de 2,5. La transducción se determinó después de un período de incubación de 48 horas, utilizando tinción de 2F5 seguido de análisis de citometría de flujo. Las células MOLT-4 transducidas con Lenti-sh5 indicaron una reducción del 75 % en la expresión de CCR5. Lenti-Cal-1 indicó una atenuación génica de CCR5 del 60 %. 72 horas después de la transducción de lenti-Cal-1, aproximadamente el 89 % de las células expresaban C46 con una reducción del 60 % en la expresión de CCR5 de las células MOLT-4 transducidas.

La Figura 10B proporciona un ensayo de transcriptasa inversa de MOLT4 con ccr5 y de MOLT4 con Cal-1, después de la infección por VIH-1. 48 horas postransducción, las células MOLT4 se infectaron con BaL a una MOI de 0,2. 7 días postransducción, se analizó la actividad de transcriptasa inversa en el sobrenadante de cultivo. La combinación de CCR5 y el inhibidor de la fusión C46 (Cal-1) mostró una supresión significativa de la actividad de la transcriptasa inversa en comparación con la de las células MOLT4 transducidas con lenti-sh5 y las células MOLT4 no transducidas.

La Figura 10C proporciona datos de la evolución temporal de un ensayo de transcriptasa inversa de tres condiciones: (a) MOLT4 transducidas con Cal-1; (b) el 80 % de MOLT4 no transducidas mezcladas con el 20 % de transducidas con Cal-1; y (c) el control simulado. La figura ilustra una reducción de más de 2 log en la actividad de transcriptasa inversa observada en células MOLT4 transducidas con Cal-1 en el día 14, en comparación con un cultivo mixto del 20 % de células MOLT4 transducidas con Cal-1 y el 80 % no transducidas, y células MOLT4 no transducidas (control simulado) en el día 14.

La Figura 10D proporciona datos de la evolución temporal para el análisis por PCR en tiempo real de transcriptasa inversa de estos tres conjuntos experimentales *in vitro*. Los datos de RT previos se confirmaron mediante este ensayo de PCR en tiempo real de transcriptasa inversa basado en TaqMan. La figura ilustra que

se observó una reducción de más de 2 log del ARN de VIH-1 extraído del sobrenadante de cultivo de células MOLT4 transducidas con Cal-1 en el día 14, en comparación con los datos de un cultivo mixto del 20 % de células MOLT4 transducidas con Cal-1 y el 80 % no transducidas, y células MOLT4 no transducidas (control simulado).

5 La Figura 11A ilustra los resultados de la detección de Cal-1 de acuerdo con las realizaciones de la presente divulgación, utilizando ensayos de dos tubos distintos en conformidad con el Método 2 en el presente documento. El ADN integrado de Cal-1 se amplificó mediante un método de PCR de ADN basado en TaqMan basado en los métodos de ensayo divulgados en el presente documento. La PCR de ADN en tiempo real se realizó con el ADN extraído de tres conjuntos de experimentos de infección basados en MOLT4. Los datos muestran que se detectó una presencia consistente de niveles de ADN integrado de Cal-1 (normalizados mediante Actina) en células MOLT4 transducidas con Cal-1 durante todo el experimento desde el día 4 hasta el día 14. El ADN de Cal-1 no se detectó en las células MOLT4 (control simulado). La reducción significativa del nivel de ADN integrado de Cal-1 en un cultivo mixto del 20 % de células MOLT4 transducidas con Cal-1 y el 80 % no transducidas fue evidente en los días 4 y 7. Para los días 10 y 14, estos niveles se habían reducido aún más a un nivel indetectable. Los números de copias de Cal-1 se normalizaron con 1000 copias de DNA de Actina.

10 La Figura 11B ilustra los resultados de la detección de VIH-1 de acuerdo con las realizaciones de la presente divulgación utilizando dos ensayos de tubos distintos en conformidad con el Método 2 en el presente documento. Se observó una reducción de más de tres logs en el nivel de ADN integrado de VIH-1 en las células MOLT4 transducidas con Cal-1 en comparación con la de las células MOLT4 no transducidas durante el día 4 al día 14 después de la infección por VIH-1. Estos datos confirman la protección de células MOLT4 frente a la infección por VIH-1 después de la transducción del vector lentivírico Cal-1. Nivel elevado de ADN de VIH-1 en un cultivo mixto del 20 % de células MOLT4 transducidas con Cal-1 y el 80 % no transducidas en el día 10 y el día 14, en comparación con los del día 4 y el día 7. Los datos de ADN de Cal-1 en un cultivo mixto del 20 % de células MOLT4 transducidas con Cal-1 y el 80 % no transducidas el día 10 y el día 14 sugirieron la pérdida de ADN de Cal-1 integrado en esos puntos de tiempo. Por lo tanto, se observó un aumento de los niveles de ADN de VIH-1 en un cultivo mixto el día 10 y el día 14. Esos datos también sugieren la función transgénica de Cal-1 de protección frente a la infección por VIH-1. Los números de copias de VIH-1 se normalizaron con 1000 copias de DNA de Actina. La Figura 12A expone un análisis intracelular de ARN de VIH-1 en células MOLT-4, basado en un ensayo de 3'LTR con el Método 2 en el presente documento. Se observó una reducción de más de 3 log del nivel integrado de ARN vírico de VIH-1 en células MOLT4 transducidas con Cal-1 en comparación con células MOLT4 no transducidas, durante los días 4 a 14 después de la infección por VIH-1.

20 La Figura 12B expone un análisis intracelular de ARN de VIH-1 en células MOLT-4, basado en un ensayo de Tat sometido a corte y empalme. Se observó un nivel similar de reducción masiva de ARN en las células MOLT4 transducidas con Cal-1, basándose en el ensayo de Tat sometido a corte y empalme. La proteína TAT generada por el ARNm de Tat sometido a corte y empalme es capaz de impulsar una cantidad masiva de ARNm de VIH-1 no sometido a corte y empalme. La detección de ARNm de Tat sometido a corte y empalme es un marcador fundamental de un transcrito inicial de VIH-1. Los números de copias del ARN de VIH-1 se normalizaron con 1.000.000 de copias de ARNm de GAPDH. Los datos de las Figuras 12A y 12B sugieren que se observó una reducción masiva de los niveles intracelulares de ARNm del VIH-1, lo que está respaldado por la gran reducción observada de los niveles de ADN integrados en las células MOLT4 transducidas con Cal-1 (véanse las Figuras 11A y 11B).

30 La Figura 13A ilustra los datos de un ensayo de transcriptasa inversa basados en las CMSP de un donante sano. Los experimentos de infección por VIH-1 se realizaron basándose en CMSP de un donante sano. La transducción de lenti-Cal-1 se realizó de la misma manera que en el experimento anterior basado en MOLT4. Se observó un nivel de reducción de más de 5 veces de la actividad de la transcriptasa inversa en las CMSP transducidas con Cal-1 después de la infección por VIH-1, en el día 4 y el día 7, comparado con el de las CMSP no transducidas.

35 La Figura 13B ilustra un análisis de PCR en tiempo real de transcriptasa inversa sobre ARN en sobrenadantes de cultivo con el Método 2. Los datos de transcriptasa inversa en la Figura 13A se confirmaron mediante un ensayo de PCR en tiempo real de transcriptasa inversa basado en TaqMan utilizando el ARN extraído del sobrenadante de cultivo. Se observó una reducción de cinco veces en el ARN de VIH-1 del sobrenadante de cultivo de las CMSP transducidas con Cal-1 el día 7 y el día 10, en comparación con las CMSP no transducidas (control simulado).

40 La Figura 14A ilustra los resultados de la detección de ADN de Cal-1 en las CMSP utilizando ensayos de dos tubos distintos en conformidad con el Método 2. El ADN integrado de Cal-1 se amplificó mediante un método de PCR de ADN basado en TaqMan descrito en el presente documento. El ADN se extrajo de dos conjuntos de experimentos de infección de CMSP. Los datos indican una presencia consistente de nivel de ADN de Cal-1 integrado (normalizado mediante Actina) en las CMSP transducidas con Cal-1 del día 4 al 10. No se detectó ADN de Cal-1 en las CMSP no transducidas (control simulado). Los números de copias de Cal-1 se normalizaron con 1000 copias de DNA de Actina. La Figura 14B ilustra la detección de ADN del VIH-1 en las CMSP. El ADN integrado del VIH-1 se amplificó mediante un método de PCR de ADN basado en TaqMan utilizando ensayos de dos tubos distintos en conformidad con el Método 2. Se observó una reducción de cinco veces en los niveles de ADN integrado de VIH-1 en las CMSP transducidas con Cal-1, en comparación con las CMSP no transducidas en el día 4. Los datos confirman la protección de las CMSP frente a la infección por VIH-1 después de la transducción del vector lentivírico Cal-1. Los números de copias de VIH-1 se normalizaron con 1000 copias de DNA de Actina. Si bien las CMSP son difíciles de transducir con Cal-1, los datos respaldan positivamente la

protección de Cal-1 frente al VIH-1.

La Figura 14C ilustra los resultados de un análisis intracelular de ARN de VIH-1 en las CMSP, basado en un ensayo de 3'LTR con el Método 2. El ARNm intracelular del VIH-1 se amplificó mediante un método de PCR en tiempo real de transcriptasa inversa en una etapa basado en TaqMan descrito en el presente documento. Se observó una reducción mayor de 4x del nivel integrado de ARN vírico de VIH-1 en las CMSP transducidas con Cal-1, en comparación con el de las CMSP no transducidas en el día 4. Los números de copias del ARN de VIH-1 se normalizaron con 1.000.000 de copias de ARNm de GAPDH.

La Figura 14D ilustra los resultados de un análisis intracelular de ARN de VIH-1 en las CMSP, basado en un ensayo de Tat sometido a corte y empalme. Se observó un nivel similar de reducción masiva en las PBMC transducidas con Cal-1, basándose en el ensayo de Tat sometido a corte y empalme. Los datos de las Figuras 14A y 14B confirman el impacto de la reducción de los niveles de ADN integrado del VIH-1 en las CMSP transducidas con Cal-1. Por lo tanto, se observó una reducción sustancial de los niveles intracelulares de ARNm del VIH-1 en las CMSP transducidas con Cal-1 (Figura 14C y Figura D). Los números de copias del ARN de VIH-1 se normalizaron con 1.000.000 de copias de ARNm de GAPDH.

Las Figuras 15A a 15E exponen ejemplos de distintos reactivos proporcionados en distintos pocillos de placas de 96 pocillos.

Descripción detallada

En general, la presente divulgación proporciona composiciones (es decir, cebadores de amplificación y sondas), métodos y kits que son particularmente útiles para la detección y/o cuantificación de ácidos nucleicos presentes en una muestra, tales como los procedentes de VIH o de un vector lentivírico. La invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

Definiciones

Como se usa en el presente documento, los términos en singular "un", "una" y "el/la" incluyen referentes plurales salvo que el contexto indique claramente otra cosa. De forma similar, la palabra "o" pretende incluir "y" a menos que el contexto indique claramente otra cosa.

Como se usa en el presente documento, un "amplicón" se define como cualquier molécula de ácido nucleico producida por una técnica de amplificación de ácidos nucleicos. En particular, un amplicón comprende una secuencia que hibrida con un cebador cuando se pone en contacto con ella, y que puede ser una molécula completa o una porción de la misma.

"Amplificación" de una secuencia de ácido nucleico diana significará una técnica de amplificación *in vitro* de dianas mediante la cual se copian secuencias dianas, produciendo amplicones que sirven como moldes para ciclos de amplificación adicionales.

Como se usa en el presente documento, "Cal-1" se refiere a un vector lentivírico que comprende un ARN horquillado corto CCR5 y un inhibidor de la fusión C46. Se describen detalles adicionales sobre Cal-1 en la solicitud pendiente publicada como publicación de EE.UU. N.º US2012/0201794.

Las expresiones "que comprende", "que incluye", "que tiene", y similares, se usan indistintamente y tienen el mismo significado. De forma similar, "comprende", "incluye", "tiene", y similares, se usan indistintamente y tienen el mismo significado. En concreto, cada uno de los términos se define de acuerdo con la definición común de la ley de patentes de Estados Unidos de "que comprende" y, por lo tanto, se interpreta como un término abierto que significa "al menos lo siguiente", y también se interpreta que no excluyen funciones adicionales, limitaciones, aspectos, etc. Por tanto, por ejemplo, "un dispositivo que tiene componentes a, b y c" significa que el dispositivo incluye al menos los componentes a, b y c. De forma similar, la frase: "un método que implica las etapas a, b y c" significa que el método incluye al menos las etapas a, b y c. Además, mientras que las etapas y los procedimientos pueden describirse en el presente documento en un orden particular, el experto en la materia reconocerá que las etapas de orden y procedimientos pueden variar.

Como se usa en el presente documento, la expresión "virus de la inmunodeficiencia humana" (VIH) se refiere a cualquier VIH, incluidas las cepas de laboratorio, cepas de tipo silvestre, cepas mutantes y cualquier muestra biológica que comprenda al menos un virus VIH, tal como, por ejemplo, un aislado clínico de VIH. Las cepas del VIH compatibles con los presentes métodos son cualquiera de las cepas que son capaces de infectar mamíferos, particularmente seres humanos. Los ejemplos son el VIH-1, el VIH-2 y el VIS.

Como se usa en el presente documento, la expresión "vector lentivírico" se utiliza para indicar cualquier forma de un ácido nucleico procedente de un lentivirus y utilizado para transferir material genético a una célula mediante transducción. La expresión abarca ácidos nucleicos del vector lentivírico, tales como ADN y ARN, formas encapsuladas de estos ácidos nucleicos y partículas víricas en las que se han empaquetado los ácidos nucleicos del vector vírico.

5 Como se usa en el presente documento, la expresión "repetición larga terminal" (LTR) se utiliza en referencia a dominios de pares de bases ubicados en los extremos de los ADN retrovíricos. Estas LTR pueden tener varios cientos de pares de bases de longitud. Las LTR a menudo proporcionan funciones fundamentales para la expresión de la mayoría de los genes eucarióticos (por ejemplo, el estímulo, iniciación y poliadenilación de transcritos). En general, la LTR comprende regiones potenciadoras y promotoras de la expresión génica (U3), y el sitio de inicio del ARN, y las secuencias de ARN no traducidas (R/U5) tales como los sitios de repetición genómica y de poliadenilación.

10 Como se usa en el presente documento, el término "cebador" se refiere a un segmento corto de ADN o molécula de ácido nucleico que contiene ADN, que (i) se aparea en condiciones de amplificación con una porción adecuada de una secuencia de ADN o ARN que va a amplificarse, y (ii) inicia y se extiende físicamente, a través de síntesis mediada por polimerasa.

15 Como se usa en el presente documento, el término "sonda" se refiere a un oligonucleótido (es decir, una secuencia de nucleótidos), ya sea de origen natural como en una digestión de restricción purificada o producida de forma sintética, que es capaz de hibridar con otro oligonucleótido de interés. Las sondas son útiles en la detección, identificación y aislamiento de secuencias génicas particulares. Se contempla que cualquier sonda utilizada en la presente divulgación estará marcada con una "molécula indicadora" o "fracción detectable" de forma que sea detectable en cualquier sistema de detección, incluyendo, pero sin limitación, sistemas enzimáticos (por ejemplo, ELISA, así como ensayos histoquímicos basados en enzimas), fluorescentes, radioactivos, calorimétricos y luminiscentes.

20 Como se usa en el presente documento, el término "TAR" se refiere al elemento genético de "respuesta de transactivación" ("*trans-activation response*") ubicado en la región R de la LTR. Este elemento interviene en la acción de tat, al unirse físicamente al transactivador vírico tat.

Como se usa en el presente documento, las frases "secuencia diana" o "ácido nucleico diana" se refieren cada una a una región de un ácido nucleico que se va a amplificar, detectar o analizar de otra manera.

30 Como se usa en el presente documento, "Tat" se refiere a la proteína transactivadora codificada por el virus que funciona como un factor de elongación. Tat es esencial para la replicación vírica como el elemento vírico clave para aumentar la expresión génica del VIH.

35 Como se usa en el presente documento, la expresión "caja TATA" se utiliza en referencia a un segmento de ADN, ubicado aproximadamente a 19-27 pares de bases cadena arriba del punto de inicio de los genes estructurales eucarióticos, a la que se une la ARN polimerasa. La caja TATA tiene aproximadamente 7 pares de bases de longitud, a menudo comprende la secuencia "TATAAAA". La caja TATA también se denomina en ocasiones "caja Hogness".

40 Como se usa en el presente documento, los términos "transducir" o "transducción" se refieren al suministro de un gen (o genes) utilizando un vector vírico o retrovírico mediante infección en lugar de mediante transfección. Por ejemplo, un gen anti-VIH portado por un vector retrovírico (un retrovirus modificado utilizado como vector para la introducción de ácido nucleico en las células) puede transducirse en una célula a través de infección y la integración del provirus. Por tanto, en "gen transducido" es un gen que se ha introducido en la célula a través de una infección lentivírica o vectorial y la integración del provirus. Los vectores víricos (por ejemplo, "vectores transductores") transducen genes en "células diana" o células hospedadoras.

45 Como se usa en el presente documento, el término "transgén" es una secuencia de ácido nucleico dentro de un vector lentivírico que normalmente no está presente en una célula, a transducirse con el vector lentivírico. El vector lentivírico sirve para introducir esta secuencia en la célula transducida.

50 Como se usa en el presente documento, el término "vector" se utiliza en referencia a las moléculas de ácido nucleico que transfieren un segmento (o segmentos) de ácido nucleico (por ejemplo, ADN) de una célula a otra.

55 Como se usa en el presente documento, la expresión "de tipo silvestre" se refiere a un gen o secuencia de ácido nucleico que se observa con mayor frecuencia en una población y, por lo tanto, se designa arbitrariamente como la forma "normal" o "de tipo silvestre" del gen o secuencia de ácido nucleico.

Vectores lentivíricos

60 En algunas realizaciones, el vector lentivírico comprende una 3' LTR inactivada o autoinactivadora. Una "3' LTR autoinactivadora" es una 3' LTR que contiene una mutación, sustitución o delección que impide que las secuencias LTR impulsen la expresión de un gen cadena abajo. Se cree que una copia de la región U3 de la 3' LTR actúa como molde para la generación de las LTR en el provirus integrado. Por tanto, cuando la 3' LTR con una delección o mutación inactivadora se integra como la 5' LTR del provirus, no es posible la transcripción a partir de la 5' LTR. Esto elimina la competencia entre el potenciador/promotor vírico y cualquier potenciador/promotor interno. Se describen 3'

LTR autoinactivadoras, por ejemplo, en Zufferey *et al.*, J. Virol., Vol. 72:9873-9880, 1998; Miyoshi *et al.*, J. Virol., Vol. 72:8150-8157, 1998; e Iwakuma *et al.*, Virology, Vol. 261:120-132, 1999. La 3' LTR puede hacerse autoinactivadora mediante cualquier método conocido en la técnica. En una realización, el elemento U3 o región de la 3' LTR contiene una eliminación de su secuencia potenciadora, preferentemente la caja TATA, los sitios Spl y NF-kappa B. Como resultado de la 3' LTR autoinactivadora, el provirus que está integrado en el genoma de la célula hospedadora comprenderá una 5' LTR inactivada. Los vectores de expresión víricos de la divulgación preferentemente no inhiben la producción de vectores en las células productoras.

En general, los vectores lentivíricos recombinantes autoinactivadores (SIN, forma *siglada de self-inactivating*) de la presente divulgación comprenden una 3' LTR que se ha vuelto sustancialmente inactiva desde el punto de vista transcripcional en virtud de deleciones de secuencias dentro de la región U3. En algunas realizaciones, los vectores lentivíricos comprenden deleciones en la región U3 de la 3'LTR, incluida la eliminación de una secuencia de la caja TATA (por ejemplo, falta la secuencia de la SEQ ID NO: 11 de la región U3 de la 3'LTR de un vector lentivírico). En el caso de los vectores lentivíricos basados en el VIH, tales vectores toleran deleciones de U3 significativas, incluida la eliminación de la caja TATA de la LTR, sin reducciones significativas en los títulos de los vectores. Por lo tanto, en algunas realizaciones, los vectores lentivíricos comprenden la eliminación de entre aproximadamente 100 y aproximadamente 160 nucleótidos de la región U3 de la 3'LTR en comparación con una región U3 de 3'LTR de tipo silvestre. En otras realizaciones, los vectores lentivíricos comprenden la eliminación de entre aproximadamente 120 y aproximadamente 140 nucleótidos de la región U3 de la 3' LTR en comparación con una región U3 de 3'LTR de tipo silvestre. En algunas realizaciones, los vectores lentivíricos comprenden la eliminación de aproximadamente 132 nucleótidos de la región U3 de la 3' LTR en comparación con una región U3 de 3'LTR de tipo silvestre.

A modo de ejemplo, la SEQ ID NO: 16 proporciona una región U3 de 3'LTR de tipo silvestre (también denominada en el presente documento "región U3 de tipo silvestre" o "VIH de tipo silvestre"); mientras que la SEQ ID NO: 15 proporciona una región U3 modificada, tal como se encuentra en un vector lentivírico. Cuando la SEQ ID NO: 15 y la SEQ ID NO: 16 se comparan, el experto en la materia apreciará que se eliminaron aproximadamente 132 nucleótidos en la región U3 de la 3'LTR del vector lentivírico, incluyendo la eliminación de la caja TATA. En algunas realizaciones, la región R de la 3'LTR no se ha alterado, es decir, una región R de tipo silvestre (véase, por ejemplo, la SEQ ID NO: 17).

Un ejemplo de un vector lentivírico que tiene una región U3 desprovista de una caja TATA es el vector lentivírico "Cal-1" (LVsh5/C46) representado en la Figura 1A. Como se ilustra en las Figuras 1B y 1D a 1I, Cal-1 comprende deleciones dentro de la región U3 de la 3' LTR que se extienden del nucleótido 423 al 556, y dichas deleciones se extienden a través de la caja TATA (en concreto, la secuencia de la SEQ ID NO: 11). En comparación con Cal-1, la región U3 de tipo silvestre de la 3'LTR del VIH comprende una caja TATA intacta (véase, por ejemplo, las Figuras 1B y 1D a 1I). De hecho, la región U3 del VIH de tipo silvestre contiene los elementos potenciadores y promotores que intervienen en la expresión basal e inducida del genoma del VIH en las células infectadas y en respuesta a la activación celular. Como es evidente, el experto en la materia apreciará que Cal-1 simplemente ilustra un único vector lentivírico y que otros vectores pueden tener una región 3'LTR distinta, por ejemplo, que incluyan regiones U3 que tengan distintas secuencias o que comprendan distintas deleciones de nucleótidos en comparación con una región U3 de tipo silvestre, y estos vectores lentivíricos distintos pueden detectarse de acuerdo con los métodos divulgados en el presente documento.

Descripción general del método

Los métodos de ensayo divulgados en el presente documento explotan las diferencias en las regiones U3 de las 3'LTR de los vectores lentivíricos y el VIH de tipo silvestre y, por lo tanto, permiten que los cebadores y/o sondas diseñados específicamente hibriden con los vectores lentivíricos pero no con el VIH de tipo silvestre, y viceversa, como se describe en el presente documento.

Cebadores

Los expertos en la materia entenderán que pueden diseñarse secuencias de cebadores con características de hibridación adecuadas basándose en las estructuras de la 3'LTR de vectores lentivíricos y del VIH. Por ejemplo, el experto en la materia entenderá que los cebadores pueden diseñarse con características de hibridación adecuadas basándose en las secuencias de la 3'LTR de vectores lentivíricos. Los cebadores divulgados en el presente documento se contemplan particularmente como componentes de reacciones de amplificación multiplex donde pueden producirse varias especies de amplicones a partir de los cebadores específicos de diana descritos en el presente documento.

En algunas realizaciones, se selecciona un cebador directo de manera que hibride con una secuencia dentro de una región U3 de la 3'LTR del vector lentivírico y/o del VIH. En algunas realizaciones, y como se describe con más detalle en el presente documento, se usa el mismo cebador directo en la amplificación tanto del vector lentivírico como del VIH (véanse las Figuras 2 y 4). En otras realizaciones, se utilizan distintos cebadores directos para amplificar el vector lentivírico y el VIH (véase la Figura 3).

En algunas realizaciones, el cebador directo se selecciona de modo que hibride con una secuencia dentro de una región U3 de una 3'LTR que tiene al menos el 85 % de identidad con la de la SEQ ID NO: 1. En otras realizaciones, el cebador directo se selecciona de modo que hibride con una secuencia dentro de una región U3 de una 3'LTR que tiene al menos el 90 % de identidad con la de la SEQ ID NO: 1. En aún otras realizaciones, el cebador directo se selecciona de modo que hibride con una secuencia dentro de una región U3 de una 3'LTR que tiene al menos el 95 % de identidad con la de la SEQ ID NO: 1.

En algunas realizaciones, el cebador directo se selecciona de modo que hibride con una secuencia dentro de una región U3 de una 3'LTR que tiene al menos el 85 % de identidad con la de la SEQ ID NO: 3. En otras realizaciones, el cebador directo se selecciona de modo que hibride con una secuencia dentro de una región U3 de una 3'LTR que tiene al menos el 90 % de identidad con la de la SEQ ID NO: 3. En aún otras realizaciones, el cebador directo se selecciona de modo que hibride con una secuencia dentro de una región U3 de una 3'LTR que tiene al menos el 95 % de identidad con la de la SEQ ID NO: 3.

Un cebador directo adecuado para su uso con los ensayos descritos en el presente documento es un cebador NuAf. El experto en la materia apreciará que, dependiendo de las secuencias U3 del vector lentivírico y el VIH, el cebador NuAf es capaz de hibridar tanto con vectores lentivíricos como con el VIH. En algunas realizaciones, el cebador NuAf comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 2 o una secuencia que tiene al menos el 90 % de identidad con la de la secuencia de la SEQ ID NO: 2 (véanse las Figuras 2 y 4).

Otro cebador directo adecuado para su uso con los ensayos divulgados en el presente documento es un cebador TATA. El cebador TATA es capaz de hibridar con el VIH, pero no con los vectores lentivíricos a los que les falta o carecen de una secuencia de la caja TATA en la región U3 de la 3'LTR. El cebador TATA comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 4 o una secuencia que tiene al menos el 90 % de identidad con la de la secuencia de la SEQ ID NO: 4 (véase la Figura 3).

En algunas realizaciones, se selecciona un cebador inverso de modo que hibride con una secuencia dentro de una región R de una 3'LTR. En otras realizaciones, se selecciona un cebador inverso de modo que hibride con una secuencia en el extremo 5' de la región R de la 3'LTR. Como se describirá adicionalmente en el presente documento, en algunas realizaciones, se utiliza el mismo cebador inverso en la amplificación tanto del vector lentivírico como del VIH de tipo silvestre, es decir, el cebador inverso está diseñado para una secuencia común dentro de la región R tanto del vector lentivírico como del VIH de tipo silvestre.

En algunas realizaciones, el cebador inverso se selecciona de modo que hibride con una secuencia dentro de una región R de una 3'LTR que tiene al menos el 85 % de identidad con la de la SEQ ID NO: 5. En otras realizaciones, el cebador inverso se selecciona de modo que hibride con una secuencia dentro de una región R de una 3'LTR que tiene al menos el 90 % de identidad con la de la SEQ ID NO: 5. En aún otras realizaciones, el cebador inverso se selecciona de modo que hibride con una secuencia dentro de una región R de una 3'LTR que tiene al menos el 95 % de identidad con la de la SEQ ID NO: 5.

Un cebador inverso adecuado para su uso con los ensayos divulgados es un cebador LTR-rev. El cebador LTR-rev comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 6. El cebador LTR-rev es capaz de hibridar tanto con vectores lentivíricos como con el VIH.

45 Sondas

En general, las sondas utilizadas en los métodos divulgados en el presente documento pertenecen a una clase de sondas llamadas "sondas FRET" (forma siglada de *Forster or fluorescence resonance energy transfer*, transferencia de energía por resonancia de fluorescencia o de Forster), es decir, las que contienen una pareja de indicador fluorescente y extintor. En algunas realizaciones, las sondas utilizadas en los métodos descritos en el presente documento son sondas TAQMAN®. Las sondas TAQMAN® (Heid *et al.*, 1996) utilizan la actividad exonucleasa 5' fluorogénica de la polimerasa Taq para medir la cantidad de secuencias diana en muestras de ácido nucleico. Las sondas TAQMAN® son oligonucleótidos que contienen un colorante fluorescente habitualmente en o cerca de la base 5', y una fracción de extinción normalmente en o cerca de la base 3'. La fracción extintora puede ser un colorante tal como TAMRA o puede ser una molécula no fluorescente tal como el ácido 4-(4-dimetilaminofenilazo)benzoico (DABCYL). Cuando se irradia, el colorante fluorescente excitado transfiere energía a la molécula de colorante de extinción cercana en lugar de fluorescer (FRET, como se señaló anteriormente). Por tanto, la proximidad entre el indicador y el extintor impide la emisión de cualquier fluorescencia mientras la sonda esté intacta. Las sondas TAQMAN® están diseñadas para aparearse con región interna de un producto de PCR. Cuando la polimerasa replica un molde al que se une una sonda TAQMAN®, su actividad exonucleasa 5' escinde la sonda. Esto finaliza la actividad del extintor (sin FRET) y el colorante indicador comienza a emitir fluorescencia que aumenta en cada ciclo de forma proporcional a la tasa de escisión de la sonda. La acumulación de productos de PCR se detecta al controlar el aumento de la fluorescencia del colorante indicador (en este procedimiento, solo las sondas están marcadas con FRET y los cebadores no están marcados). El ensayo TAQMAN® utiliza parámetros de ciclo térmico y condiciones de reacción de PCR universales. Debido a que la escisión se produce solo si la sonda hibrida con la diana, la fluorescencia detectada se origina en la amplificación específica. El procedimiento de

hibridación y escisión no interfiere con la acumulación exponencial del producto.

En otras realizaciones, las sondas utilizadas en los métodos divulgados son balizas moleculares. Las balizas moleculares son sondas para la identificación de secuencias de nucleótidos específicas presentes dentro de las células (Tyagi *et al.*, (1998) Nature Biotechnology 16:49-53). La baliza molecular puede estar compuesta solo de ácido nucleico, tal como ADN o ARN, o puede estar compuesta de un conjugado de ácido peptidonucleico (APN). La unión de la baliza molecular a secuencias de nucleótidos específicas permite la identificación de la presencia de las secuencias *in vitro* o *in vivo*. Una baliza molecular incluye un conjugado (por ejemplo, una estructura tal como una perla etiquetada con puntos cuánticos), una sonda, un fluoróforo y una fracción extintora. La sonda es un oligonucleótido monocatenario que comprende una estructura de tallo y bucle donde un grupo de unión hidrófila está unido a un extremo del oligonucleótido monocatenario y la fracción extintora está unida al otro extremo del oligonucleótido monocatenario. El fluoróforo puede ser cualquier colorante orgánico fluorescente o un único punto cuántico de tal manera que su emisión no se solapa con la de la perla etiquetada con puntos cuánticos. La fracción de extinción apaga, convenientemente, la luminiscencia del fluoróforo. Puede utilizarse en el conjugado descrito anteriormente cualquier fracción de extinción adecuada que extinga la luminiscencia del fluoróforo.

En aún otras realizaciones, las sondas utilizadas en los métodos divulgados son sondas de hibridación doble. En general, las sondas de hibridación doble usan dos sondas de oligonucleótidos específicas de secuencia además de dos cebadores de ADN específicos de secuencia. Las dos sondas están diseñadas para unirse a secuencias adyacentes en la diana. Las sondas de hibridación doble están marcadas con una pareja de colorantes que presentan FRET. El colorante donante está unido al extremo 3' de la primera sonda, mientras que el colorante aceptador está unido al extremo 5' de la segunda sonda.

Durante la PCR en tiempo real, la excitación se realiza a una longitud de onda específica para el colorante donante, y la reacción se controla a la longitud de onda de emisión del colorante aceptador. En la etapa de apareamiento, las sondas hibridan con sus secuencias diana en una disposición de cabeza a cola. Este apareamiento acerca los colorantes donante y aceptador, permitiendo que tenga lugar la FRET, dando como resultado la emisión fluorescente por parte del aceptador. La cantidad creciente del aceptador es proporcional a la cantidad de producto de PCR presente.

Los expertos en la materia apreciarán que las sondas con características de hibridación adecuadas pueden diseñarse basándose en las estructuras y secuencias de los vectores lentivíricos y del VIH de tipo silvestre. Por ejemplo, el experto en la materia entenderá que las sondas pueden diseñarse basándose en las secuencias de las regiones U3 y R de la 3'LTR que son exclusivas del vector lentivírico o del VIH. Por ejemplo, se puede diseñar una sonda que hibride con una región U3 del vector lentivírico para la exclusión de una región U3 de la 3'LTR de tipo silvestre y viceversa. Como se indica en el presente documento, determinados vectores lentivíricos comprenden una región U3 que, en comparación con una región U3 de tipo silvestre, comprende determinadas deleciones dentro de la secuencia U3, y el experto en la materia podrá diseñar una sonda que hibride con estas regiones U3 del vector lentivírico, pero no a regiones U3 de tipo silvestre.

En algunas realizaciones, los métodos divulgados en el presente documento utilizan una sonda de unión que se aparea a secuencias que abarcan la región U3 y la región R de la 3'LTR del vector lentivírico (es decir, un "sitio de unión"). La Figura 1C ilustra un sitio de unión de un vector lentivírico, comprendiendo el sitio de unión una región U3 que comprende determinadas deleciones en comparación con una región U3 de tipo silvestre. Una sonda de unión diseñada apropiadamente puede comprender una porción que hibrida con este sitio de unión o con una porción o fragmento de este sitio de unión. En algunas realizaciones, la sonda de unión comprende una primera porción y una segunda porción, donde la primera porción está diseñada para hibridar con una porción o un fragmento de una secuencia de nucleótidos dentro de la región U3 de la 3'LTR del vector lentivírico; y donde la segunda porción está diseñada para hibridar con una porción o un fragmento de una secuencia de nucleótidos dentro de la región R de la 3'LTR.

En algunas realizaciones, la región U3 de la 3'LTR en la que la sonda de unión hibrida comprende una secuencia que tiene al menos el 80 % de identidad con la de la SEQ ID NO: 12. En otras realizaciones, la región U3 de la 3'LTR del vector lentivírico en la que la sonda de unión hibrida comprende una secuencia que tiene al menos el 90 % de identidad con la de la SEQ ID NO: 12. En realizaciones adicionales, la región U3 de la 3'LTR del vector lentivírico en la que la sonda de unión hibrida comprende una secuencia que tiene al menos el 95 % de identidad con la de la SEQ ID NO: 12. En otras realizaciones adicionales, la región U3 de la 3'LTR del vector lentivírico en el que la sonda de unión hibrida comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 12.

En algunas realizaciones, la región R de la 3'LTR del vector lentivírico en el que la sonda de unión hibrida comprende una secuencia que tiene al menos el 90 % de identidad con la de la SEQ ID NO: 13. En otras realizaciones, la región R de la 3'LTR del vector lentivírico en el que la sonda de unión hibrida comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 13.

El experto en la materia reconocerá que puede diseñarse cualquier sonda de unión para adaptarse a las distintas regiones U3 y regiones R de cualquier vector lentivírico. En algunas realizaciones, la sonda de unión comprende la

secuencia de la SEQ ID NO: 14, o una secuencia que tiene al menos el 90 % de identidad con la de SEQ ID NO: 14. En algunas realizaciones, la sonda de unión está conjugada a fracción detectable, tal como un indicador fluorescente. En algunas realizaciones, el indicador fluorescente se selecciona del grupo que consiste en Tex-615, Tye-563, Tye-665, Joe, Cy3, Max, Rox, Tet, Texas Red-X, Tamara, y Yakima Yellow. En otras realizaciones, el indicador fluorescente comprende un colorante de cianina, tal como la indodicarbocianina (Cy5TM).

Otra sonda adecuada para su uso con los ensayos divulgados es una sonda para TAR, es decir, una sonda específica para el elemento TAR en el 3'LTR del VIH. En algunas realizaciones, la sonda para TAR es una sonda TaqMan®, tal como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, la sonda se selecciona de modo que hibride con una secuencia dentro de la 3'LTR que tiene al menos el 85 % de identidad con la de la SEQ ID NO: 7. En otras realizaciones, la sonda para TAR se selecciona de modo que hibride con una secuencia dentro de la 3'LTR que tiene al menos el 90 % de identidad con la de la SEQ ID NO: 7. En aún otras realizaciones, la sonda para TAR se selecciona de modo que hibride con una secuencia dentro de la 3'LTR que tiene al menos el 95 % de identidad con la de la SEQ ID NO: 7. En algunas realizaciones, la sonda para TAR comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 8. En algunas realizaciones, la sonda para TAR está conjugada a una fracción detectable, tal como un indicador fluorescente. En algunas realizaciones, el indicador fluorescente se selecciona del grupo que consiste en Tex-615, Tye-563, Tye-665, Joe, Cy3, Max, Rox, Tet, Texas Red-X, Tamara, y Yakima Yellow. En otras realizaciones, la sonda para TAR contiene un indicador fluorescente y un extintor. En algunas realizaciones, el indicador fluorescente es fluoresceína (CAS 2321-07-5).

Otra sonda adecuada para su uso con los ensayos divulgados es una sonda para TATA, es decir, una sonda específica para la caja TATA en la región U3 de una 3'LTR de tipo silvestre. En algunas realizaciones, la sonda para TATA es una sonda TaqMan®. En algunas realizaciones, la sonda para TATA hibrida (la diana es la cadena antisentido) con las secuencias U3 de la 3'LTR. En algunas realizaciones, la sonda de TATA se selecciona de modo que hibride con una secuencia dentro de la 3'LTR que tiene al menos un 85 % de identidad con la de la SEQ ID NO: 9. En otras realizaciones, la sonda de TATA se selecciona de modo que hibride con una secuencia dentro de la región U3 de la 3'LTR que tiene al menos el 90 % de identidad con la de la SEQ ID NO: 9. En aún otras realizaciones, la sonda de TATA se selecciona de modo que hibride con una secuencia dentro de la región U3 de la 3'LTR que tiene al menos el 95 % de identidad con la de la SEQ ID NO: 9. En algunas realizaciones, la sonda para TATA comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 10. En algunas realizaciones, la sonda para TATA contiene un indicador fluorescente y un extintor. En algunas realizaciones, el indicador fluorescente se selecciona del grupo que consiste en Tex-615, Tye-563, Tye-665, Joe, Cy3, Max, Rox, Tet, Texas Red-X, Tamara y Yakima Yellow. En otras realizaciones, la sonda para TAR contiene un indicador fluorescente y un extintor. En algunas realizaciones, el indicador fluorescente es fluoresceína (CAS 2321-07-5).

Métodos de ensayo

Las muestras se pueden recoger utilizando kits de extracción de ADN convencionales disponibles en el mercado y conocidos por los expertos en la materia. En algunas realizaciones, el kit de extracción de ADN es un kit de extracción de ADN de BioLine (disponible en BioLine, Taunton, MA). En algunas realizaciones, las fuentes, pero sin limitación, de las muestras incluyen muestras de sangre, muestras de plasma, muestras de tejido, muestras de biopsia o muestras creadas después de clasificación por citometría de flujo.

El ADN, por ejemplo, el ADN provírico o ADN transgénico, puede extraerse de la muestra utilizando métodos conocidos por los expertos en la materia, tales como el procedimiento descrito por Maniatis *et al.*, Molecular cloning: A laboratory manual, (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY), 1982. El procedimiento implica la preparación de un lisado celular seguido de digestión con proteinasa K, la obtención de la purificación de ADN mediante una extracción con fenol de múltiples etapas, la precipitación con etanol y la digestión con ribonucleasa.

En lugar de ADN, en los métodos de ensayo descritos en el presente documento puede utilizarse ARN. Cuando se utiliza ARN, se necesita transcripción inversa a el ADN complementario (ADNc) mediante una transcriptasa inversa adecuada. Por lo tanto, los métodos siguientes, que describen la amplificación y el posterior análisis de ADN, son susceptibles de análisis de ARN. En algunas realizaciones, el ARN vírico puede aislarse utilizando métodos conocidos tales como el descrito en Boom, R. *et al.* (J. Clin. Microbiol. 28(3): 495-503, 1990), o mediante otros métodos convencionales tales como el método de fenol ácido (por ejemplo, el método del ácido guanidinio-fenol-cloroformo (AGPC, forma siglada de *acid guanidiniumphenol-chloroform*)), el procedimiento de isotiocianato de guanidinio, empleando así el método de Chomczynski y Sacchi (Anal. Biochem. 162, 156-159 (1987)). En algunas realizaciones, el ADNc se puede sintetizar con SENSISCRIP® RT (Qiagen). En algunas realizaciones, se utiliza una transcriptasa inversa de una etapa y un kit de polimerasa Taq. En otras realizaciones, se sintetiza el ADNc, seguido de un método de PCR en tiempo real de ADN.

Amplificación

Los expertos en la materia conocen técnicas para la amplificación de secuencias de ácido nucleico. Un método para amplificar una secuencia diana es con una técnica mediada por polimerasa llamada reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En general, la PCR es un método para aumentar la concentración de un segmento de una

secuencia diana en una mezcla de ADN genómico sin clonación o purificación. Este procedimiento para amplificar la secuencia diana consiste en introducir un gran exceso de dos cebadores oligonucleotídicos en la mezcla de ADN que contiene la secuencia diana deseada, seguido de una secuencia precisa de ciclos térmicos en presencia de una ADN polimerasa. Los dos cebadores son complementarios a sus respectivas cadenas de la secuencia diana bicatenaria. Para efectuar la amplificación, la mezcla se desnaturaliza y a continuación los cebadores se aparean a sus secuencias complementarias dentro de la molécula diana. Después del apareamiento, los cebadores se extienden con una polimerasa (por ejemplo, una ADN polimerasa) para formar una nueva pareja de cadenas complementarias. Las etapas de desnaturalización, apareamiento de cebadores y extensión con la polimerasa se pueden repetir muchas veces (es decir, la desnaturalización, el apareamiento y la extensión constituyen un "ciclo"; puede haber numerosos "ciclos") para obtener una alta concentración de un segmento amplificado (el amplicón) de la secuencia diana deseada. La longitud del segmento amplificado de la secuencia diana deseada está determinada por las posiciones relativas de los cebadores entre sí y, por lo tanto, esta longitud es un parámetro controlable. La reacción en cadena de la polimerasa ("PCR") se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N.º 4.683.202; patente de EE.UU. N.º 4.683.195; patente de EE.UU. N.º 4.000.159; patente de EE.UU. N.º 4.965.188; patente de EE.UU. N.º 5.176.995.

La PCR se puede utilizar cualitativa o cuantitativamente. Una técnica de amplificación cuantitativa conocida es la "PCR en tiempo real". El término "PCR en tiempo real", como se usa en el presente documento, significa que se controla durante la reacción una señal emitida por el ensayo de PCR, como un indicador de la producción de amplicón durante cada ciclo de amplificación de PCR, es decir, en "tiempo real", a diferencia de los métodos convencionales de PCR, en que se detecta una señal de ensayo en el punto final de la reacción de PCR. La PCR en tiempo real generalmente se basa en la detección y cuantificación de un indicador fluorescente, tal como las descritas en el presente documento. La señal del indicador aumenta en proporción directa a la cantidad de producto de PCR en una reacción. Por lo tanto, registrando la cantidad de emisión de fluorescencia en cada ciclo, es posible controlar la reacción de PCR durante una fase exponencial en que el primer aumento significativo en la cantidad de producto de PCR se correlaciona con la cantidad inicial de molde diana. Para una descripción general de la "PCR en tiempo real", véase Dehee *et al.* J. Virol. Meth. 102:37-51 (2002); y Aldea *et al.* J. Clin. Microbiol., 40:1060-1062 (2002).

La transcriptasa inversa-reacción en cadena de la polimerasa se refiere a la generación de ADN complementario a partir de un molde de ARN y al uso adicional del ADN complementario como molde para realizar la PCR para duplicar, descrito anteriormente, y amplificar el ADN. En la reacción de transcriptasa inversa, las mezclas de reacción se incuban a una temperatura suficiente para sintetizar una molécula de ADN complementaria a todo o parte del molde de ARN. Después de la reacción de transcripción inversa, la reacción se incuba a una temperatura suficiente para amplificar la molécula de ADN sintetizada.

Amplificación de un ácido nucleico lentivírico

Un aspecto de la presente divulgación es un método de amplificación de un ácido nucleico lentivírico, por ejemplo, un transgén lentivírico. En algunas realizaciones, la amplificación del ácido nucleico lentivírico utiliza un cebador directo que hibrida con una porción de la región U3 de la 3'LTR y un cebador inverso que hibrida con una porción de la región R de la 3'LTR. En algunas realizaciones, la amplificación del ácido nucleico lentivírico utiliza un cebador directo NuAf y un cebador inverso LTR-rev. En algunas realizaciones, el amplicón producido a partir de la amplificación comprende entre aproximadamente 100 y aproximadamente 600 ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, se cuantifica una cantidad del amplicón producido.

En algunas realizaciones, la amplificación del ácido nucleico lentivírico comprende el empleo de una sonda específica para una secuencia dentro de la 3'LTR del vector lentivírico, es decir, la sonda solo se hibridará con la 3'LTR del vector lentivírico y no se hibridará con una 3'LTR de tipo silvestre, tal como la 3'LTR del VIH. En algunas realizaciones, la sonda está optimizada para las deleciones en la región U3 de la 3'LTR del vector lentivírico, en comparación con una 3'LTR de tipo silvestre que no comprende tales deleciones. En algunas realizaciones, las deleciones incluyen la delección de una secuencia de la caja TATA (de nuevo, en comparación con una región U3 de tipo silvestre). En algunas realizaciones, la sonda optimizada para las deleciones en la región U3 de la 3'LTR está diseñada para abarcar una porción de la región U3 de la 3'LTR del vector lentivírico y una porción de la región R de la 3'LTR del vector lentivírico. En algunas realizaciones, la sonda optimizada para las deleciones en la región U3 de la 3'LTR es una sonda de unión. En algunas realizaciones, la sonda de unión comprende una secuencia que tiene al menos el 90 % de identidad con la de la SEQ ID NO: 14. En algunas realizaciones, la amplificación del ácido nucleico lentivírico o transgén lentivírico comprende cuantificar una cantidad de un ácido nucleico amplificado, tal como mediante la detección de una cantidad de un indicador fluorescente conjugado con la sonda.

En algunas realizaciones, la amplificación del ácido nucleico lentivírico comprende introducir en una muestra un cebador directo, un cebador inverso y una sonda de unión, y realizar PCR de acuerdo con procedimientos conocidos por los expertos en la materia. En algunas realizaciones, el cebador directo es NuAf, el cebador inverso es LTR-rev y la sonda de unión comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 14. En algunas realizaciones, se realizan 45 - 50 ciclos de PCR. En algunas realizaciones, el método de PCR es PCR en tiempo real o PCR cuantitativa en tiempo real. En algunas realizaciones, el ácido nucleico es ARN y el ARN se convierte primero en ADNc. En algunas realizaciones,

el ácido nucleico es ARN y se utiliza transcriptasa inversa PCR o transcriptasa inversa-PCR cuantitativa.

Metodología general del ensayo multiplex

5 Otro aspecto de la presente divulgación es un método multiplex para la detección y/o cuantificación de un ácido nucleico lentivírico y de un ácido nucleico de VIH en una muestra. En algunas realizaciones, el método multiplex tiene lugar en un único sistema de reacción o cámara (en adelante "tubo de reacción"). En otras realizaciones, el método multiplex tiene lugar en tubos de reacción distintos. En algunas realizaciones, el ácido nucleico lentivírico es un transgén lentivírico. En algunas realizaciones, el ácido nucleico del VIH es ADN provírico. En algunas
10 realizaciones, el ácido nucleico lentivírico y/o el ácido nucleico del VIH son ARN, y antes de la amplificación el ARN se convierte primero (por ejemplo, mediante un proceso de transcripción inversa) en ADNc.

En algunas realizaciones, el método multiplex utiliza cebadores directos capaces de hibridar con secuencias dentro de las regiones U3 de la 3'LTR del vector lentivírico y/o del VIH. En algunas realizaciones, el método multiplex utiliza
15 cebadores inversos capaces de hibridar con secuencias dentro de las regiones R de la 3'LTR del vector lentivírico y/o del VIH. En algunas realizaciones, el método multiplex utiliza los mismos cebadores directo e inverso tanto para la amplificación del ácido nucleico lentivírico como para la amplificación del ácido nucleico del VIH. En estos casos, el experto en la materia podrá seleccionar un cebador directo capaz de hibridar con la misma secuencia dentro de la región U3 tanto del ácido nucleico del VIH de tipo silvestre como del ácido nucleico del vector lentivírico. En otras
20 realizaciones, el método multiplex utiliza distintos cebadores directos, pero los mismos cebadores inversos. En algunas realizaciones, los cebadores directos se seleccionan de un cebador NuAf y un cebador TATA. En algunas realizaciones, el cebador directo es un cebador para LTR-rev.

En algunas realizaciones, una primera sonda específica para el ácido nucleico lentivírico se emplea en un
25 procedimiento de PCR (por ejemplo, un procedimiento de PCR en tiempo real) para amplificar y/o cuantificar una cantidad de ácido nucleico lentivírico, y una segunda sonda específica para VIH se emplea en un procedimiento de PCR para amplificar y/o cuantificar una cantidad de un ácido nucleico del VIH, donde la primera y la segunda sondas comprenden distintas fracciones detectables. En algunas realizaciones, la primera sonda es una capaz de hibridar con una secuencia dentro de la 3'LTR del vector lentivírico pero no con una secuencia dentro de la 3'LTR del VIH de
30 tipo silvestre. En algunas realizaciones, la primera sonda está optimizada para deleciones de secuencia en la 3'LTR de un ácido nucleico del vector lentivírico en comparación con la secuencia de la 3'LTR de tipo silvestre.

En algunas realizaciones, la primera sonda es una sonda de unión específica para una 3' LTR del ácido nucleico lentivírico, por ejemplo, un sitio de unión dentro de la 3'LTR. En algunas realizaciones, la sonda de unión es una que
35 es capaz de hibridar con al menos una porción de una secuencia dentro de la región U3 del vector lentivírico y capaz de hibridar con al menos una porción de una secuencia dentro de la región R del vector lentivírico. En algunas realizaciones, la sonda de unión comprende una primera porción capaz de hibridar con una primera secuencia que tiene al menos el 90 % de identidad con la de la SEQ ID NO: 12; y una segunda porción capaz de hibridar con la secuencia de la SEQ ID NO: 13.

40 En algunas realizaciones, la segunda sonda se selecciona de una sonda de TATA o una sonda para TAR.

En algunas realizaciones, la amplificación del ácido nucleico lentivírico y el ácido nucleico de VIH comprende
45 cuantificar una cantidad de los ácidos nucleicos amplificados, tal como mediante la detección de señales correspondientes a distintos indicadores fluorescentes conjugados con las sondas empleadas. En otras realizaciones, se cuantifica una cantidad de un amplicón de ácido nucleico lentivírico y una cantidad de un amplicón de ácido nucleico de VIH después de la separación electroforética de los amplicones de ácido nucleico lentivírico y los amplicones de ácido nucleico de VIH.

50 En algunas realizaciones, los métodos multiplex comprenden determinar una relación de una cantidad de un ácido nucleico lentivírico con respecto a una cantidad de un ácido nucleico de VIH presentes en una muestra. En algunas realizaciones, la relación determinada se utiliza para evaluar la eficacia del tratamiento o la terapia génica, tal como con células madre transducidas con un vector lentivírico. En algunas realizaciones, las cantidades de ácidos nucleicos lentivíricos y del VIH pueden determinarse a lo largo de un tratamiento, es decir, a lo largo de varios
55 puntos de tiempo distintos para evaluar la eficacia terapéutica del tratamiento (en que, por ejemplo, se pueden comparar un primer punto de tiempo de evaluación y un segundo punto de tiempo de evaluación, en que una mayor cantidad de ácido nucleico lentivírico en comparación con el ácido nucleico del VIH del primer punto de tiempo de evaluación al segundo punto de tiempo de evaluación es indicativo de la eficacia terapéutica). En algunas realizaciones, se administra un tratamiento adicional dependiendo de la evaluación proporcionada.

60 "Método 1" Multiplex

Con referencia a la Figura 2, un aspecto de la presente divulgación es un método multiplex para la detección y/o
65 cuantificación de un ácido nucleico lentivírico y de un ácido nucleico de VIH en una muestra y en el mismo tubo de reacción ("Método 1"). En algunas realizaciones, el método comprende en primer lugar preparar ácidos nucleicos presentes en una muestra, es decir, ADN o ARN, para amplificación. Si el ARN es el material de partida dentro de la

muestra, entonces el ARN se convierte en ADNc, de acuerdo con los medios conocidos por los expertos en la materia.

5 Una vez que los ácidos nucleicos están preparados, se introducen en la muestra los cebadores directo e inverso. En este método particular, se utilizan los mismos cebadores directo e inverso para la amplificación tanto del ácido nucleico lentivírico como del ácido nucleico de VIH (véase la Figura 2). En algunas realizaciones, el cebador directo es un cebador NuAf. En algunas realizaciones, el cebador directo tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, el cebador inverso hibrida con una secuencia dentro de la región R de la 3'LTR tanto del ácido nucleico lentivírico como del ácido nucleico de VIH. En algunas realizaciones, el cebador directo es un cebador para LTR-rev. En algunas realizaciones, el cebador inverso tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 6. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, se cree que la especificidad de este método de ensayo particular se basa en el cebador directo. De nuevo, sin desear quedar ligados a teoría alguna, se cree que, debido al conjunto de cebadores único, la eficacia de la amplificación tanto del ácido nucleico lentivírico como del ácido nucleico de VIH es la misma.

15 Después de la introducción de los cebadores en la muestra, se introducen dos sondas distintas, en que una primera sonda que comprende una primera fracción detectable es específica para el ácido nucleico lentivírico, y en que una segunda sonda que comprende una segunda fracción detectable es específica para el ácido nucleico del VIH (véase la Figura 2). En algunas realizaciones, la primera sonda específica para el ácido nucleico lentivírico está optimizada para las delecciones dentro de la región U3 de la 3'LTR del vector lentivírico en comparación con un ácido nucleico de VIH de tipo silvestre (de modo que la primera sonda puede hibridar con el ácido nucleico lentivírico pero con el ácido nucleico del VIH). En algunas realizaciones, la sonda es una sonda de unión específica para un sitio de unión dentro de la 3' LTR del ácido nucleico lentivírico, por ejemplo, un sitio de unión que abarca una región U3 y R de un 3'LTR. En algunas realizaciones, la sonda de unión es capaz de hibridar con la primera región dentro de la 3'LTR y con una segunda región dentro de la 3'LTR. En algunas realizaciones, la sonda de unión es capaz de hibridar con una porción o un fragmento de una secuencia de nucleótidos dentro de una región U3 de la 3'LTR; y con una porción o un fragmento de una secuencia de nucleótidos dentro de una región R de la 3'LTR. En algunas realizaciones, la sonda de unión comprende una primera porción capaz de hibridar con una primera secuencia que tiene al menos el 90 % de identidad con la de la SEQ ID NO: 12; y una segunda porción capaz de hibridar con la secuencia de la SEQ ID NO: 13. En algunas realizaciones, la sonda de unión comprende una secuencia que tiene al menos el 80 % de identidad con la de la SEQ ID NO: 14. En otras realizaciones, la sonda de unión comprende una secuencia que tiene al menos el 90 % de identidad con la de la SEQ ID NO: 14. En aún otras realizaciones, la sonda de unión comprende una secuencia que tiene al menos el 95 % de identidad con la de la SEQ ID NO: 14.

35 En algunas realizaciones, la segunda sonda específica para el ácido nucleico del VIH es una sonda para TATA. En algunas realizaciones, la segunda sonda tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 10, o una secuencia que tiene al menos el 90 % de identidad con la de SEQ ID NO: 10. En algunas realizaciones, la primera sonda está marcada con Cy5. En algunas realizaciones, la segunda sonda está marcada con FAM

40 Después de la introducción de las sondas, se permite que tenga lugar la amplificación de acuerdo con protocolos convencionales. En algunas realizaciones, se permiten entre aproximadamente 45 y aproximadamente 50 ciclos de PCR. En algunas realizaciones, la PCR es PCR en tiempo real. Cuando el ARN es un material de partida, y como alternativa a la primera conversión del ARN a ADNc, se puede utilizar PCR de transcriptasa inversa o transcriptasa inversa en tiempo real.

45 En algunas realizaciones, se cuantifican las cantidades de ácido nucleico lentivírico y de ácido nucleico de VIH, tal como mediante la detección de señales procedentes de las distintas fracciones detectables conjugadas con las distintas sondas. En algunas realizaciones, una relación de una cantidad de un ácido nucleico lentivírico con respecto a una cantidad de un ácido nucleico de VIH. En algunas realizaciones, la relación determinada se utiliza para evaluar la eficacia del tratamiento o la terapia génica, tal como con células madre transducidas con un vector lentivírico. En algunas realizaciones, las cantidades de ácidos nucleicos lentivíricos y del VIH pueden determinarse a lo largo de un tratamiento, es decir, a lo largo de varios puntos de tiempo distintos para evaluar la eficacia terapéutica del tratamiento (en que, por ejemplo, se pueden comparar un primer punto de tiempo de evaluación y un segundo punto de tiempo de evaluación, en que una mayor cantidad de ácido nucleico lentivírico en comparación con el ácido nucleico del VIH del primer punto de tiempo de evaluación al segundo punto de tiempo de evaluación es indicativo de la eficacia terapéutica). En algunas realizaciones, se administra un tratamiento adicional dependiendo de la evaluación proporcionada.

"Método 2" de doble tubo

60 Con referencia a la Figura 3, un aspecto de la presente divulgación es un método multiplex para la detección y/o cuantificación de un ácido nucleico lentivírico y de un ácido nucleico de VIH en una muestra, en que el método multiplex tiene lugar en dos tubos de reacción distintos ("Método 2"). Un primer tubo de reacción comprende todos los componentes necesarios para la amplificación de un ácido nucleico lentivírico. Un segundo tubo de reacción comprende todos los componentes necesarios para la amplificación de un ácido nucleico de VIH. Al igual que el "Método 1" descrito anteriormente, este ensayo nuevamente explota la diferencia entre la estructura del ácido nucleico lentivírico de la 3'LTR y la estructura del ácido nucleico de VIH de la 3'LTR de tipo silvestre y, en particular,

utiliza la caja TATA como un sitio de inicio de la amplificación para el ácido nucleico de VIH.

Al igual que con el método anterior, el método comprende en primer lugar preparar ácidos nucleicos presentes en una muestra, es decir, ADN o ARN, para amplificación. Si el ARN es el material de partida dentro de la muestra, entonces el ARN se convierte en ADNc. Una vez que los ácidos nucleicos están preparados, se introducen los cebadores directo e inverso. En este método particular, se utilizan distintos cebadores directos en la amplificación tanto del ácido nucleico lentivírico como del ácido nucleico de VIH (ver Figura 3). Para la amplificación del ácido nucleico lentivírico, el cebador directo es un cebador NuAf. En algunas realizaciones, el cebador directo tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 2. Para la amplificación del ácido nucleico de VIH, el cebador directo es un cebador para TATA. En algunas realizaciones, el cebador directo tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 4.

En algunas realizaciones, se utiliza el mismo cebador inverso en la amplificación tanto del ácido nucleico lentivírico como del ácido nucleico de VIH. En algunas realizaciones, el cebador inverso hibrida con una secuencia dentro de la región R de la 3'LTR tanto del ácido nucleico lentivírico como del ácido nucleico de VIH. En algunas realizaciones, el cebador directo es un cebador para LTR-rev. En algunas realizaciones, el cebador inverso tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 6. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, se cree que la especificidad de este método de ensayo particular se basa en el cebador directo. De nuevo, sin desear quedar ligados a teoría alguna, se cree que, debido al conjunto de cebadores único, la eficacia de la amplificación tanto del ácido nucleico lentivírico como del ácido nucleico de VIH es la misma.

Sin desear quedar ligados a teoría alguna, se cree que la especificidad de la reacción en el primer tubo de reacción (amplificación del ácido nucleico del vector lentivírico) se basa en la sonda específica utilizada. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, se cree que la especificidad de la reacción en el segundo tubo de reacción (amplificación del ácido nucleico del VIH) se basa en el cebador directo utilizado. De nuevo, sin desear quedar ligados a teoría alguna, se cree que, dado que estos ensayos se basan en un cebador inverso común (p. ej., LTR-rev), y la posición del cebador directo esta unos pocos cientos de bases distanciada, la eficacia de la amplificación es relativamente idéntica, de modo que el ensayo puede proporcionar datos confiables y comparativos tanto en la detección y/o cuantificación de ácido nucleico de LV como de ácido nucleico de VIH.

Después de la introducción de los cebadores en la muestra, se introducen dos sondas distintas, en que una primera sonda que comprende una primera fracción detectable es específica para el ácido nucleico lentivírico, y en que una segunda sonda que comprende una segunda fracción detectable es específica para el ácido nucleico del VIH (véase la Figura 3). En algunas realizaciones, la primera sonda específica para el ácido nucleico lentivírico está optimizada para las deleciones dentro de la región U3 de la 3'LTR del vector lentivírico en comparación con un ácido nucleico de VIH de tipo silvestre (de modo que la primera sonda puede hibridar con el ácido nucleico lentivírico pero con el ácido nucleico del VIH). En algunas realizaciones, la sonda es una sonda de unión específica para un sitio de unión dentro de la 3' LTR del ácido nucleico lentivírico, por ejemplo, un sitio de unión que abarca una región U3 y R de un 3'LTR. En algunas realizaciones, la sonda de unión es capaz de hibridar con la primera región dentro de la 3'LTR y con una segunda región dentro de la 3'LTR. En algunas realizaciones, la sonda de unión es capaz de hibridar con una porción o un fragmento de una secuencia de nucleótidos dentro de una región U3 de la 3'LTR; y con una porción o un fragmento de una secuencia de nucleótidos dentro de una región R de la 3'LTR. En algunas realizaciones, la sonda de unión comprende una primera porción capaz de hibridar con una primera secuencia que tiene al menos el 90 % de identidad con la de la SEQ ID NO: 12; y una segunda porción capaz de hibridar con la secuencia de la SEQ ID NO: 13. En algunas realizaciones, la sonda de unión comprende una secuencia que tiene al menos el 80 % de identidad con la de la SEQ ID NO: 14. En otras realizaciones, la sonda de unión comprende una secuencia que tiene al menos el 90 % de identidad con la de la SEQ ID NO: 14. En aún otras realizaciones, la sonda de unión comprende una secuencia que tiene al menos el 95 % de identidad con la de la SEQ ID NO: 14.

En algunas realizaciones, la segunda sonda específica para el ácido nucleico del VIH es una sonda para TAR. En algunas realizaciones, la segunda sonda tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 8, o al menos el 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 8. En algunas realizaciones, la primera sonda está marcada con Cy5. En algunas realizaciones, la segunda sonda está marcada con FAM.

Después de la introducción de las sondas, se permite que tenga lugar la amplificación de acuerdo con protocolos convencionales. En algunas realizaciones, se permiten entre aproximadamente 45 y aproximadamente 50 ciclos de PCR. En algunas realizaciones, la PCR es PCR en tiempo real. Cuando el ARN es un material de partida, y como alternativa a la primera conversión del ARN a ADNc, se puede utilizar PCR de transcriptasa inversa o transcriptasa inversa en tiempo real.

En algunas realizaciones, se cuantifican las cantidades de ácido nucleico lentivírico y de ácido nucleico de VIH, tal como mediante la detección de señales procedentes de las distintas fracciones detectables conjugadas con las distintas sondas. En algunas realizaciones, una relación de una cantidad de un ácido nucleico lentivírico con respecto a una cantidad de un ácido nucleico de VIH. En algunas realizaciones, la relación determinada se utiliza para evaluar la eficacia del tratamiento o la terapia génica, tal como con células madre transducidas con un vector lentivírico. En algunas realizaciones, las cantidades de ácidos nucleicos lentivíricos y del VIH pueden determinarse a lo largo de un tratamiento, es decir, a lo largo de varios puntos de tiempo distintos para evaluar la eficacia

5 terapéutica del tratamiento (en que, por ejemplo, se pueden comparar un primer punto de tiempo de evaluación y un segundo punto de tiempo de evaluación, en que una mayor cantidad de ácido nucleico lentivírico en comparación con el ácido nucleico del VIH del primer punto de tiempo de evaluación al segundo punto de tiempo de evaluación es indicativo de la eficacia terapéutica). En algunas realizaciones, se administra un tratamiento adicional dependiendo de la evaluación proporcionada.

"Método 3" Multiplex

10 Con referencia a la Figura 4, un aspecto de la presente divulgación es un método multiplex para la detección y/o cuantificación de un ácido nucleico lentivírico y de un ácido nucleico de VIH en una muestra, en que el método multiplex tiene lugar en un único tubo de reacción ("Método 3"). En algunas realizaciones, el método comprende en primer lugar preparar ácidos nucleicos presentes en una muestra, es decir, ADN o ARN, para amplificación. Si el ARN es el material de partida dentro de la muestra, entonces el ARN se convierte en ADNc.

15 Una vez que los ácidos nucleicos están preparados, se introducen los cebadores directo e inverso. En este método particular, se utilizan los mismos cebadores directo e inverso para la amplificación tanto del ácido nucleico lentivírico como del ácido nucleico de VIH (véase la Figura 4). En algunas realizaciones, el cebador directo es un cebador NuAf. En algunas realizaciones, el cebador directo tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, el cebador inverso hibrida con una secuencia dentro de la región R de la 3'LTR tanto del ácido nucleico lentivírico
20 como del ácido nucleico de VIH. En algunas realizaciones, el cebador directo es un cebador para LTR-rev. En algunas realizaciones, el cebador inverso tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 6. En este método particular, y en comparación con el Método 1 y el Método 2 en el presente documento, no se utilizan sondas. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, se cree que debido al conjunto de cebador único, la eficacia de la amplificación tanto del ácido nucleico de LV como del ácido nucleico de VIH es la misma.

25 En este método, la amplificación produce un amplicón de ácido nucleico lentivírico y un amplicón de ácido nucleico de VIH que tiene distintos tamaños (véase la Figura 7, que muestra los tamaños relativos de los amplicones del ADN extraído del Ejemplo 1, en el presente documento). En algunas realizaciones, la diferencia de tamaño entre los dos amplicones varía entre aproximadamente 100 y aproximadamente 560 pares de bases, siendo el amplicón del vector lentivírico más corto (es decir, teniendo comparativamente menos bases o un peso molecular más bajo) que el amplicón del VIH. En otras realizaciones, la diferencia de tamaño entre los dos amplicones varía entre aproximadamente 100 y aproximadamente 550 pares de bases, siendo el amplicón del vector lentivírico más corto (es decir, teniendo comparativamente menos bases o un peso molecular más bajo) que el amplicón del VIH. Los amplicones de distintos tamaños se pueden distinguir y/o separar entre sí utilizando cualquier método de separación electroforética convencional (por ejemplo, separación por electroforesis con un gel de agarosa junto con un procedimiento de tinción de ADN, tal como Sybr-green, EvaGreen). Después, los amplicones separados se pueden cuantificar de tal manera que se puedan obtener las cantidades de ácido nucleico del vector lentivírico y nucleico del VIH en la muestra.

40 En algunas realizaciones, se puede utilizar PCR Droplet Digital (BioRad) para separar el tamaño de la banda con el colorante EvaGreen instantáneamente con detección cuantitativa precisa y permitir la generación de una cuantificación absoluta del número de copias de ácido nucleico LV y ácido nucleico de VIH simultáneamente, con un conjunto de cebadores de PCR único.

45 La tecnología de PCR Droplet digital es un método de PCR digital que utiliza un sistema de gotitas de emulsión de agua y aceite. Las gotitas se forman en una emulsión de agua y aceite para formar las particiones que separan las moléculas de ADN molde. Las gotitas cumplen esencialmente la misma función que tubos de ensayo o pocillos en una placa individuales en los que tiene lugar la reacción de PCR, aunque en un formato mucho más pequeño. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, se cree que el sistema de PCR Droplet digital divide las muestras de ácido nucleico en miles de gotitas del tamaño de nanolitros, y la amplificación por PCR se lleva a cabo dentro de cada gota.

50 Las gotitas sustentan la amplificación por PCR de las moléculas molde que contienen y utilizan reactivos y flujos de trabajo similares a los utilizados en un método de PCR en tiempo real convencional basado en tinción de EvaGreen del ADN bicatenario. Después de la PCR, cada gotita se analiza o lee con una idea similar a la del citómetro de flujo para determinar la fracción de gotitas positivas por PCR en la muestra original. Cuando se utiliza el método descrito en la Figura 4, dos lados del amplicón son distintos en el amplicón del LV y el amplicón del VIH-1. Los colorantes intercalados, EvaGreen, se unen al ADN bicatenario. Un amplicón de ADN bicatenario más largo, en el caso de VIH-1, produce una intensidad mucho mayor que la generada a partir de un amplicón de ADN bicatenario más corto, en caso de Cal-1. Estos datos se analizan utilizando la estadística de Poisson para determinar la concentración de molde de ADN diana en la muestra original. Mediante este método, se podría identificar cuántas copias de amplicón de VIH-1 y Cal-1 hay en la muestra original.

Kits

65 En otro aspecto de la presente divulgación se encuentran kits para llevar a cabo los métodos reivindicados. En

- algunas realizaciones, los kits de la presente divulgación proporcionan al menos un cebador directo, al menos un cebador inverso y al menos una sonda. En algunas realizaciones, los kits de la presente divulgación incluyen un cebador NuAf, un cebador LTR-rev y una sonda específica para un vector lentivírico. En otras realizaciones, los kits de la presente divulgación incluyen un cebador NuAf, un cebador LTR-rev y una sonda que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 14. En aún otras realizaciones, los kits de la presente divulgación incluyen un cebador NuAf, un cebador LTR-rev, una sonda específica para un vector lentivírico y una sonda para TATA. En realizaciones adicionales, los kits de la presente divulgación incluyen un cebador NuAf, un cebador LTR-rev, una sonda que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 14 y una sonda para TATA.
- 10 En otras realizaciones, los kits de la presente divulgación comprenden un cebador NuAf, un cebador de TATA, un cebador LTR-rev, una sonda específica para un vector lentivírico y una sonda para TAR. En otras realizaciones, los kits de la presente divulgación comprenden un cebador NuAf, un cebador de TATA, un cebador LTR-rev, una sonda que tiene la SEQ ID NO: 14 y una sonda para TAR.
- 15 Los kits de la presente divulgación pueden comprender adicionalmente otros componentes que incluyen tubos de reacción, instrucciones, tampones, reactivos y oligonucleótidos.

Ejemplos

- 20 En el presente documento se divulgan una serie de ejemplos no limitantes que ilustran adicionalmente determinadas realizaciones de la presente divulgación.

Ejemplo 1

- 25 Se prepararon tres conjuntos de muestras basados en células MOLT-4: un experimento *in vitro* inicial basado en células MOLT-4.

- a) Células MOLT-4 solas sin transducción de lentivirus Cal-1;
 b) el 80 % de células MOLT-4 y el 20 % de células MOLT-4 con transducción de lentivirus Cal-1. El grado de células transducidas se determinó mediante análisis de citometría de flujo de expresión de C46. Esta configuración experimental fue para determinar el efecto transgénico de una población mixta de células MOLT-4 originales (80 %) y células MOLT-4 transducidas Cal-1 (20 %);
 c) MOLT4 con Cal-1 (100 %). El 100 % de las células se transducen con Cal-1 según lo determinado por la expresión de C46 en citometría de flujo.

- Aproximadamente 0,5 millones de estas células estaban infectadas con VIH-1 BaL. Estas células se cultivaron en un matraz de cultivo de 25 cm² utilizando 10 ml de un medio basado en RPMI-1640 convencional que contenía SFB al 10 %, con suplemento de glutamax 1X en un incubador de CO₂. Se tomaron muestras de sobrenadante de cultivo (1 ml) en el día 4, 7, 10, 14 para el análisis tanto del ensayo de RT (Fig. 5A) así como del ensayo de PCR en tiempo real (RT) de transcriptasa inversa (Fig. 5B y C). Las muestras de células cultivadas también se prepararon en los días 4, 7, 10, 14 para análisis de análisis intracelulares de ADN (Fig. 6AB) y de ARN (Fig. 6C). En cada punto de tiempo, se transfirieron 0,6 ml de la suspensión de células cultivadas para el análisis de ADN y 0,4 ml de la suspensión de células cultivadas para análisis de ARN a tubos Eppendorf de 2,0 ml convencionales. Estos tubos se centrifugaron a 900 g durante 3 min. Se eliminó el sobrenadante. Se añadió un ml de PBS a cada tubo, seguido de centrifugación a 900 g durante 3 min. Se eliminó otra vez el sobrenadante. Los sedimentos celulares se utilizaron para análisis de ARN y ADN.

- Se utilizó el ensayo de transcriptasa inversa (ensayo de RT) (Figura 5A) para medir la cantidad de lentivirus en 10 µl de sobrenadante de cultivo liberado de MOLT-4 infectadas. El ensayo de RT fue capaz de detectar el VIH-1 y el vector lentivírico en los sobrenadantes de cultivo (véase Suzuki K, *et al.* Poly A-linked non-isotopic microtiter plate reverse transcriptase assay for sensitive detection of clinical human immunodeficiency virus isolates. J Virol Methods 1995, 55: 347-356).

- Las MOLT-4 (●) mostraron un nivel de RT altamente aumentado el día 10, el día 14, indicando una alta producción de VIH-1 liberado de MOLT-4 infectadas a lo largo del día de cultivo. Estos datos indicaron que el experimento de infección de este conjunto salió muy bien;

MOLT4 Cal20% (▲) mostraron una buena reducción (10 veces) de VIH-1 liberado de MOLT-4 infectadas el día 14;

MOLT4 Cal-1 (■) mostraron una gran reducción de VIH-1 liberado de las células infectadas;

- El ensayo de RT pudo detectar la actividad de RT del VIH-1 y el ensayo de RT también pudo detectar el lentivirus Cal-1, lo que se creía que era un arrastre del procedimiento de transfección de MOLT-4. En el análisis del día 4, la actividad de RT de MOLT4 Cal-1 (■) fue mayor que la de MOLT4 (●). La actividad de RT de MOLT4 Cal20 % (▲) también era ligeramente más alta que la de MOLT4 (●).

La detección de ARN específico de VIH-1 (Figura 5B) se realizó basándose en un ensayo de tubo único en conformidad con el método de ensayo que utiliza un ensayo de tubo único en conformidad con el Método Multiplexado 1 descrito en el presente documento. Se extrajo ARN de 500 µl de sobrenadante de cultivo utilizando un sistema de extracción automatizado (EasyMag, bioMerieux), con una configuración de 60 µl de volumen de elución.

Nota: LightCycler 480 (Roche) y la placa blanca de 96 pocillos para LightCycler-480 se utilizaron en un análisis de PCR en tiempo real (RT) de transcriptasa inversa en una etapa.

Se elaboró una mezcla maestra por protocolo para 8 patrones y el análisis de muestras.

Mezcla maestra: para la detección doble que detecta ARN de VIH-1 y ARN de Cal-1

Tabla 1 Una mezcla maestra para la detección doble de ARN de VIH-1 y ARN de Cal-1, en que el volumen total de la mezcla era de 34 microlitros.

agua sin ADNasa ARNasa	10,60
B x 2 (del kit)	20,00
NuAf (20 µM)	0,50
Imai-LTR-Rev (20 µM)	0,50
sonda de Tata de VIH-1 (5 µM) con marcador FAM	0,60
sonda de Cal-1 (5 µM) con marcador Cy5	0,60
enzima RT (del kit)	0,40
Inhibidor de ARNasa (del kit)	0,80

Se dispensó una alícuota de 34 µl de mezcla maestra en cada pocillo de una placa de 96 pocillos (véase la figura 15A) de la posición designada como en un formato de ensayo a continuación. Después de la adición de 6 µl de patrones de VIH-1 y Cal-1 y de las muestras de prueba a cada pocillo de la posición designada, se realizó la RT-PCR utilizando las siguientes condiciones: 45 °C-20 min, 95 °C-2 min 45 ciclos de (94 °C -7 s, 60 °C-30 s).

Reactivos

Kit SensiFAST Probe One step (BioLine n.ºBIO-76005)

Patrones

Patrones de VIH-1: 0, 4, 4x10, 4x102, 4x103, 4x104, 4x105, 4x106 copias/µl

Patrones de Cal-1: 0, 2, 2x10, 2x102, 2x103, 2x104, 2x105, 2x106 copias/µl

Los datos de detección de ARN específico de VIH-1 (Figura 5B) revelaron que en el día 4, los tres experimentos mostraron el mismo nivel de VIH-1 en el ARN extraído del sobrenadante, utilizando un ensayo de tubo único en conformidad con el Método 1. La cantidad de VIH-1 en MOLT4 Cal-1 (■) mostró una reducción de más de 1000 veces de VIH-1 liberado a partir de MOLT-4 infectadas (●) en el día 10 y el día 14. MOLT4 Cal20% (▲) mostraron una reducción de aproximadamente 10 veces de VIH-1 liberado de MOLT-4 infectadas el día 14, lo que fue idéntico a los datos del ensayo de RT.

La detección de ARN específico de Cal-1 (Figura 5C), utilizando un ensayo de tubo único en conformidad con el Método 1, indicó que se observó una reducción del nivel de ARN de Cal-1 en el cultivo a lo largo del tiempo, en células MOLT4 transducidas con Cal-1 (●). La cantidad de Cal-1 fue probablemente el resultado de lentivirus arrastrado cuando las células MOLT-4 se transdujeron con Cal-1 en el día-0. No se detectó ARN de Cal-1 en células MOLT-4 no transducidas. Solo se detectó una pequeña cantidad de Cal-1 de RNA en el día 4, del grupo de MOLT4 Cal20 % (A) en el día 4.

Los datos de RT mostraron niveles de RT ligeramente elevados de MOLT4 Cal-1 (■) en comparación con células MOLT4 solas (●) el día 4. Esto podría haberse atribuido al arrastre de lentivirus. Además, se observó un nivel muy pequeño de RT elevada en MOLT4 Cal20 % (▲), en comparación con la infección de MOLT-4. Esta RT ligeramente elevada podría haber sido indicativa de un bajo nivel de contribución del arrastre de lentivirus. Los niveles de ARN de Cal-1 en el sobrenadante en las muestras del día 14 fueron de aproximadamente 1/1000 del nivel de ARN de VIH-1 en el sobrenadante de cultivo, indicando un nivel extremadamente menor de arrastre de ARN de Cal-1.

Ejemplo 2A

El ADN integrado de VIH-1 (Figura 6A) y el ADN integrado de Cal-1 (Figura 6B) se generaron basándose en un ensayo de tubo único en conformidad con el Método 1 y como se describe adicionalmente en el presente

documento. Se extrajo el ADN de los sedimentos celulares preparados en los días 4, 7, 10, 14 utilizando kits Purlink Genomic DNA (ThermoFisher) con 60 µl de volumen de elución.

5 Nota: En este análisis de PCR en tiempo real en una etapa se utilizaron LightCycler 480 (Roche) y una placa blanca de 96 pocillos para LightCycler-480.

Se elaboraron dos mezclas maestras por protocolo para 8 patrones y el análisis de muestras.

- 10 i) La Mezcla maestra 1 es para la detección doble que detecta ADN de VIH-1 y ADN de Cal-1
ii) La Mezcla maestra 2 es para la detección de Actina

Tabla 2 Mezcla maestra 1 para PCR: La Mezcla maestra es para la detección doble que detecta ADN de VIH-1 y ADN de Cal-1.

agua sin ADNasa ARNasa	11,7
B 10 x	2,0
MgSO ₄ (5 mM)	0,8
NuAf (20 µM)	0,25
Imai-LTR-Rev (20 µM)	0,25
Sonda de Tata (5 µM) con marcador FAM	0,3
sonda de Cal-1 (5 µM) con marcador Cy5	0,3
TAQ ACCUPRIME	0,4

15 Tabla 3 La Mezcla maestra 2 para PCR es para la detección de ACTINA.

agua sin ADNasa ARNasa	12,0
B 10 x	2,0
MgSO ₄ (5 mM)	0,8
Cebador directo de Actina (20 µM)	0,25
Cebador directo de Actina (20 µM)	0,25
Sonda Taq para Actina (5 µM), marcador Cy5	0,3
TAQ ACCUPRIME	0,4

20 Se dispensó una alícuota de 34 µl de Mezcla maestra 1 (detección de VIH-1 y Cal-1) en cada pocillo de una placa de 96 pocillos de la posición designada como en un formato de ensayo a continuación, y se dispensó una alícuota de 16 µl de Mezcla maestra 2 (detección de Actina) en cada pocillo de una placa de 96 pocillos distinta, como en un formato de ensayo a continuación (véase la FIG. 15B).

25 Después de la adición de 6 µl de los patrones de VIH-1 y Cal-1, y de las muestras de prueba para cada pocillo de la posición designada y 3 µl de patrones de Actina y de muestras de prueba para cada pocillo de la posición designada, La PCR se inició con la siguiente condición: 95 °C-2 min, 45 ciclos de (94 °C-15 s, 60 °C-30 s)

Reactivos

TAQ ACUPRIME (Life-Technology n.º 12339016)

30 Patrones

Patrones de VIH-1: 0, 4, 4x10, 4x102, 4x103, 4x104, 4x105, 4x106 copias/µl

35 Patrones de Cal-1: 0, 2, 2x10, 2x102, 2x103, 2x104, 2x105, 2x106 copias/µl

Patrones de Actina: 0, 2, 2x10, 2x102, 2x103, 2x104, 2x105, 2x106 copias/µl

40 Los datos de ADN integrado de VIH-1 se normalizaron con 106 copias de GAPDH (Figura 6A). Durante el período de cultivo se observó un aumento significativo de los niveles de ADN de VIH-1 en células MOLT4. Esto es indicativo de un alto nivel de integración de VIH-1 en células MOLT4.

45 MOLT4 Cal-1-20 % mostraron que el ADN de VIH-1 era detectable el día 10 y el día 14. Sin embargo, se observó que el nivel de ADN de VIH-1 era aproximadamente 10-50 veces menor en comparación con las células MOLT4 solas. El ADN de VIH-1 no se detectó en células MOLT4 transducidas al 100% con Cal-1 expuestas a VIH. Se cree que el vector transducido Cal-1 protegió a las células MOLT-4 de la infección por VIH-1.

Los datos de ADN integrado de Cal-1 se normalizaron con 106 copias de GAPDH (Figura 6B). Durante el período de cultivo se observó un aumento significativo de los niveles de ADN de Cal-1 en células MOLT4 transducidas al 100 %

con Cal-1. Esto fue indicativo de un alto nivel de integración de VIH-1 en células MOLT4.

MOLT4 Cal-1-20 % mostraron que se detectaba ADN de VIH-1 en el día 4 y el día 7. Sin embargo, se observó que el nivel de ADN de Cal-1 era 20-60 veces menor en comparación con las células MOLT4 transducidas al 100% con Cal-1. En MOLT4 Cal-1-20 % se observó una disminución del nivel de ADN de Cal-1 en el día 10 y el día 14. Esto se correlacionó con los datos de ADN de VIH-1. Debido a la pérdida de ADN de Cal-1 con esta configuración experimental, los niveles de ADN de VIH-1 se elevaron en el día 10 y el día 14 (Figura 6A). El ADN de Cal-1 no se detectó en células MOLT4 solas. Cal-1

10 Ejemplo 2B

La Figura 6C proporciona gráficos que muestran los resultados de los experimentos que permiten la identificación del número de copias de ARN de VIH-1 utilizando el Método 1. Para detectar el nivel de ARN intercelular de VIH-1, se analizó el ARNm de LTR específico de VIH-1 (Figura 6C). Se extrajo ARN de los sedimentos celulares preparados en los días 4, 7, 10, 14, utilizando el sistema ReliaPrep RNA Mini prep (Promega) con 60 µl de volumen de elución.

Nota: LightCycler 480 (Roche) y la placa blanca de 96 pocillos para LightCycler-480 se utilizaron en este análisis de análisis de PCR en tiempo real (RT) de transcriptasa inversa de una etapa.

Se hicieron dos mezclas maestras por protocolo para 8 patrones y el análisis de muestras.

Mezcla maestra 1 para PCR: La mezcla maestra es para la detección de ARNm de VIH-1.

25 Mezcla maestra 2 para PCR: La mezcla maestra es para la detección de ARNm de GAPDH.

Tabla 4 La Mezcla maestra 1 para PCR es para la detección de ARNm de VIH-1.

agua sin ADNasa ARNasa	11,20
B x 2 (del kit)	20,00
Cebador directo de Tata (20 µM)	0,50
Imai-LTR-Rev (20 µM)	0,50
sonda de Tata de VIH-1 (5 µM) con marcador FAM	0,60
enzima RT (del kit)	0,40
Inhibidor de ARNasa (del kit)	0,80

Tabla 5 La Mezcla maestra 2 es para la detección que detecta ARNm de GAPDH

agua sin ADNasa ARNasa	5,60
B x 2 (del kit)	10,00
Cebador directo de GAPDH (20 µM)	0,25
Cebador directo de GAPDH (20 µM)	0,25
Sonda Taq para GAPDH (5 µM), marcador Cy5	0,30
enzima RT (del kit)	0,20
Inhibidor de ARNasa (del kit)	0,40

Se dispensó una alícuota de 34 µl de Mezcla maestra 1 (detección de VIH-1) en cada pocillo de una placa de 96 pocillos de la posición designada como en un formato de ensayo a continuación, y se dispensó una alícuota de 16 µl de Mezcla maestra 2 (detección de GAPDH) en cada pocillo de una placa de 96 pocillos distinta, como en un formato de ensayo a continuación (véase la FIG. 15C).

Después de la adición de 6 µl de los patrones de VIH-1 y de las muestras de prueba para cada pocillo de la posición designada y 3 µl de patrones de GAPDH y de muestras de prueba para cada pocillo de la posición designada. La RT-PCR se inició con la siguiente condición: 45 °C-20 min, 95 °C-2 min, 45 ciclos de (94 °C -7 s, 60 °C-30 s)

40 Reactivos

Kit SensiFAST Probe One step (BioLine n.ºBIO-76005)

45 Patrones

Patrones de VIH-1: 0, 4, 4x10, 4x102, 4x103, 4x104, 4x105, 4x106 copias/µl

Patrones de GAPDH: 0, 2, 2x10, 2x102, 2x103, 2x104, 2x105, 2x106 copias/μl

Los datos del análisis de ARNm de VIH-1 se normalizaron con 106 copias de la expresión de ARNm de GAPDH (Figura 6C). Se detectaron altos niveles de ARNm de LTR de VIH-1 asociado a células específicas de VIH-1 en células MOLT4 no transducidas (●) durante el período de cultivo.

Por otro lado, se observó una reducción significativa (aproximadamente 1000 veces) del ARNm de LTR de VIH-1 de VIH-1 asociado a células en células MOLT4 transducidas al 100 % con Cal-1 (■) el día 10 y el día 14. El nivel de reducción del grupo experimental de MOLT4 Cal-1-20% (10-100 veces) en el ARNm de LTR de VIH-1 de VIH-1 asociado a células (▲) fue indicativo de protección parcial frente a la infección por VIH en el día 10. Estas observaciones sugirieron que Cal-1 fue capaz de inducir una reducción de la infección por VIH de más de 1000 veces en las células MOLT4.

A pesar de que el nivel de ADN de VIH que no se detecta en las células MOLT4 transducidas con Cal-1, el ARNm de LTR de VIH-1 asociado a células todavía era detectable (■), como se ilustra en la Figura 6C. Esto fue un indicio de que se estaba teniendo lugar un nivel muy bajo de transcripción de ARN a partir de presumiblemente una población muy pequeña de ADN integrado de VIH-1 en células MOLT-4.

La cantidad de ADN añadido a cada reacción de PCR tenía una equivalencia en células estimada de 1-2 x 10e5 células. Por lo tanto, la sensibilidad de detección del VIH-1 en este método de ensayo fue de 2 copias por 1-2 x 10e5 células. Si la frecuencia de integración del VIH-1 era inferior a 2 copias por 1-2 x 10e5 células, el ensayo no podía detectar el ADN de VIH-1 utilizando este método de ensayo.

Era posible que los niveles de ARNm de LTR de VIH-1 observados fueran el resultado de una fracción muy pequeña de células MOLT4, que fracasaron en transducirse con Cal-1.

Ejemplo 3

El ejemplo 3 ilustra los resultados de dos métodos de ensayo distintos ilustrados en la Figura 2 (Método 1) y la Figura 3 (Método 2), en que los métodos se compararon utilizando ADN, obtenido del Ejemplo 1, en el presente documento. El resultado de la Tabla 6 utiliza un método de ensayo multiplex, que tiene lugar en un único tubo de reacción (Método 1); mientras que el resultado en las Tablas 7 y 8 utiliza un método de ensayo multiplex que tiene lugar en dos tubos de reacción distintos (Método 2). Basándose en los datos de las tablas 6, 7 y 8, ambos ensayos tienen un desempeño similar, es decir, los datos cuantitativos obtenidos de ambos métodos fueron similares. Por consiguiente, ambos métodos, como se divulga en el presente documento, son capaces de amplificar un ácido nucleico lentivírico y un ácido nucleico de VIH, y de cuantificar los niveles de ácido nucleico lentivírico amplificado y de ácido nucleico de VIH amplificado.

Tabla 6 Ensayo utilizando un conjunto de cebadores único con sondas específicas para VIH-1 marcadas con FAM y de Cal-1 marcadas con Cy5 en un único tubo de PCR

Datos de Cal-1 marcado con Cy5					
Pocillo	Fluor.	Contenido	Cq	número de copias/μl	Número de copias normalizado /1000 copias de GAPDH
A02	Cy5	CSM	N/E	N/E	
B02	Cy5	Cal-1 Patr. 01	N/E	2	
C02	Cy5	Patr. 02	38,34	20	
D02	Cy5	Patr. 03	34,2	200	
E02	Cy5	Patr. 04	29,82	2000	
F02	Cy5	Patr. 05	27,25	20000	
G02	Cy5	Patr. 06	25,54	200000	
H02	Cy5	Patr. 07	18,68	2000000	
A04	Cy5	Solo MOLT4	N/E	N/E	
B04	Cy5	Solo MOLT4	N/E	N/E	
C04	Cy5	MOLT4 con infección por VIH-1	N/E	N/E	
D04	Cy5	MOLT4 con infección por VIH-1	N/E	N/E	
E04	Cy5	MOLT4 con transducción de Cat1	22,85	308600	48575
F04	Cy5	MOLT4 con transducción con Cat1	23,01	279000	43916

(continuación)

Datos de VIH-1 marcado con FAM					
Pocillo	Fluor.	Contenido	Cq	NC	
A03	FAM	CSM	N/E	N/E	
B03	FAM	VIH Patr. 11	N/E	2	
C03	FAM	Patr. 12	38,67	20	
D03	FAM	Patr. 13	34,67	200	
E03	FAM	Patr. 14	30,64	2000	
F03	FAM	Patr. 15	27,27	20000	
G03	FAM	Patr. 16	23,3	200000	
H03	FAM	Patr. 17	18,17	2000000	
A04	FAM	Solo MOLT4	N/E	N/E	
B04	FAM	Solo MOLT4	N/E	N/E	
C04	FAM	MOLT4 con infección por VIH-1	30,67	2134	818
D04	FAM	MOLT4 con infección por VIH-1	29,01	2003	768
E04	FAM	MOLT4 con transducción con Cat1	N/E	N/E	
F04	FAM	MOLT4 con transducción con Cat1	N/E	N/E	

Tabla 7 Uso de un único tubo del conjunto de cebadores con una sonda específica para Cal-1 marcada con Cy5

Pocillo	Fluor.	Contenido	Cq	número de copias/μl	Número de copias normalizado /1000 copias de GAPDH
A05	Cy5	CSM	N/E	N/E	
B05	Cy5	Patr. 21	N/E	2	
C05	Cy5	Patr. 22	37,75	20	
D05	Cy5	Patr. 23	34,75	200	
E05	Cy5	Patr. 24	30,23	2000	
F05	Cy5	Patr. 25	28,18	20000	
G05	Cy5	Patr. 26	26,06	200000	
H05	Cy5	Patr. 27	19,83	2000000	
A06	Cy5	Solo MOLT4	N/E	N/E	
B06	Cy5	Solo MOLT4	N/E	N/E	
C06	Cy5	MOLT4 con infección por VIH-1	N/E	N/E	
D06	Cy5	MOLT4 con infección por VIH-1	N/E	N/E	
E06	Cy5	MOLT4 con transducción con Cat1	23,45	388000	61074
F06	Cy5	MOLT4 con transducción con Cat1	23,26	441300	69463

Tabla 8 Reacción utilizando otro tubo único del conjunto de cebadores específicos de VIH-1 con sonda marcada con FAM.

Pocillo	Fluor.	Contenido	Cq	número de copias/μl	N.º de copias normalizado /1000 copias de GAPDH
A08	FAM	CSM	N/E	N/E	
B08	FAM	VIH Patr. 31	N/E	2	
C08	FAM	Patr. 32	38,65	20	
D08	FAM	Patr. 33	33,86	200	
E08	FAM	Patr. 34	30,13	2000	
F08	FAM	Patr. 35	25,66	20000	
G08	FAM	Patr. 36	21,74	200000	
H08	FAM	Patr. 37	17,61	2000000	

(continuación)

Pocillo	Fluor.	Contenido	Cq	número de copias/μl	N.º de copias normalizado /1000 copias de GAPDH
A09	FAM	Solo MOLT4	N/E	N/E	
B09	FAM	MOLT4 solo MOLT4 con VIH-1	N/E	N/E	
C09	FAM	infección MOLT4 con VIH-1	31,35	966	370
D09	FAM	infección MOLT4 withCat1	31,55	862	331
E09	FAM	transducción MOLT4 withCat1	N/E	N/E	
F09	FAM	transducción	N/E	N/E	
Pocillo	Fluor.	Contenido	Cq	número de copias/μl	N.º de copias normalizado /1000 copias de GAPDH
A08	FAM	CSM	N/E	N/E	
B08	FAM	VIH Patr. 31	N/E	2	
C08	FAM	Patr. 32	38,65	20	
D08	FAM	Patr. 33	33,86	200	
E08	FAM	Patr. 34	30,13	2000	
F08	FAM	Patr. 35	25,66	20000	
G08	FAM	Patr. 36	21,74	200000	
H08	FAM	Patr. 37	17,61	2000000	
A09	FAM	Solo MOLT4	N/E	N/E	
B09	FAM	Solo MOLT4	N/E	N/E	
C09	FAM	MOLT4 con infección por VIH-1	31,35	966	370
D09	FAM	MOLT4 con infección por VIH-1	31,55	862	331
E09	FAM	MOLT4 con transducción con Cat1	N/E	N/E	
F09	FAM	MOLT4 con transducción con Cat1	N/E	N/E	

Ejemplo 4

- 5 Se analizaron muestras clínicas de VIH-1 para evaluar la sensibilidad de detección de VIH-1 para el ensayo basado en LTR recientemente desarrollado. En general, el estudio se realizó para evaluar la sensibilidad de detección del ensayo de VIH-1 desarrollado y para confirmar cualquier reactividad cruzada con el ADN del VIH-1, se utilizaron muestras clínicas de pacientes con VIH-1. Se analizaron catorce muestras clínicas de VIH-1 para evaluar la sensibilidad de detección de VIH-1. Se extrajo ADN de 1 ml de muestras de sangre de pacientes con el kit QIAamp DNA Blood Mini (Qiagen N.º de Cat. 51104), con un volumen de elución de 60 μl. El análisis por PCR se realizó como en el protocolo proporcionado en el Ejemplo 5.

OBJETIVOS

- 15 1) Determinar si el ensayo de VIH-1 es lo suficientemente sensible como para detectar ADN de VIH-1 extraído de pacientes positivos para VIH-1 con el ensayo del Método-2.
2) Determinar si el ensayo de Cal-1 no puede efectuar ninguna reacción cruzada con el ADN extraído de pacientes positivos para VIH-1.

20 Preparación de las muestras

Para los análisis se utilizaron catorce muestras positivas para VIH-1. Para el análisis de detección de VIH-1 y Cal-1 se extrajo ADN de 1 ml de sangre (aproximadamente $0,3-0,7 \times 10^6$ linfocitos CD4⁺).

25 Resultados

- 30 Los números de copias de VIH-1 y Cal-1 se calcularon mediante los patrones y se normalizaron con 1.000.000 de copias de ADN de ACTINA. Ambos patrones generaron líneas lineales, véase la Figura 9. Fueron válidos ambos ensayos, de VIH-1 y Cal-1. El análisis de ADN de VIH-1 pudo detectar 14 de 14 muestras (muestras A-N), indicado en la Figura 9. El ensayo de ADN de Cal-1 no se detectó en ninguna de las 14 muestras. El ensayo de Cal-1 no tuvo

ninguna reactividad cruzada con el ADN extraído de los pacientes positivos para VIH-1. Los niveles de ensayo de ADN de VIH-1 en las muestras clínicas estaban en los niveles similares obtenidos con los datos de 2 y 20 células U1 adicionadas, indicando que la configuración experimental del Ejemplo 4 en el presente documento estaba en un nivel similar al contexto clínico real.

5

Ejemplo 5

Se realizó otro experimento basado en el Ejemplo 5, que muestra los resultados del experimento que permite la identificación del número de copias de ADN de VIH-1 y de Cal-1, ensayos de dos tubos distintos en conformidad con el Método 2

10

Se prepararon tres conjuntos de muestras basados en muestras de linfocitos T CD4+ *ex vivo*, obtenidos de un único donante:

15

- a) Linfocitos T CD4+ no transducidos
- b) CD4 transducidos con Cal-1-lenti a una MOI de 2 (5x10⁶ células)
- c) CD4 transducidos con Cal-1-lenti a una MOI de 10 (5x10⁶ células)

20

La configuración a) es el control negativo del experimento. La configuración b) son linfocitos T CD4⁺ transducidos con Cal-1 con una MOI de 2. La configuración c) son linfocitos T CD4⁺ transducidos con Cal-1 con una MOI de 10.

25

Estas muestras se obtuvieron el día 14 después de la transducción de los linfocitos T CD4+ con Cal-1-lenti con un protocolo convencional de transducción de Cal-1. El día 14, 5 millones de células de tres fuentes de linfocitos T CD+ no transducidos y transducidos se almacenaron en una fase de vapor de nitrógeno líquido de manera crioconservada.

30

Se recontaron las células U1. Se adicionaron alícuotas de 2, 20, 200, 2000 células U1 a linfocitos CD4 conteniendo 1 x 10⁶ células. Otra alícuota de 1 x 10⁶ linfocitos CD4 se utilizó sin el control adicionado (debe tenerse en cuenta que 5x10⁶ células de los CD4 transducidos se dividieron en cinco alícuotas de la misma cantidad, que contenían 1 x 10⁶ células por alícuota). El ADN se extrajo con kits PurLink Genomic DNA (ThermoFisher) con 60 µl de volumen de elución. Básicamente, se crearon muestras clínicas simuladas adicionando células U1 en los tres grupos de linfocitos T CD4+ anteriores. Se seleccionaron las células U1 porque portan dos copias del genoma del VIH-1 integrado en una célula individual. La configuración experimental se enumera de la siguiente manera:

35

- a) 0, 2, 20, 200 y 2000 células U1 por 1 x 10⁶ de linfocitos T CD4+ no transducidos
- b) 0, 2, 20, 200 y 2000 células U1 por 1 x 10⁶ de linfocitos T CD4+ transducidos con Cal-1-lenti a una MOI de 2
- c) 0, 2, 20, 200 y 2000 células U1 por 1 x 10⁶ de linfocitos T CD4+ transducidos con Cal-1-lenti a una MOI de 10

40

Los datos de ADN integrado de VIH-1 (Figura 8A) y ADN integrado de Cal-1 (Figura 8B) se obtuvieron utilizando ensayos de dos tubos distintos en conformidad con el Método 2.

Se elaboraron tres mezclas maestras por protocolo para 8 patrones y el análisis de muestras.

45

- i) La Mezcla maestra 1 es para la detección de la detección de ADN de VIH-1 (Tabla 9)
- ii) La Mezcla maestra 2 es para la detección de la detección de ADN de Cal-1 (Tabla 10)
- iii) La Mezcla maestra 3 es para la detección de la detección de Actina (Tabla 11)

Tabla 9 Mezcla maestra 1 para PCR para la detección de ADN de VIH-1, las cantidades totales fueron de 34 microlitros.

agua sin ADNasa ARNasa	12,40
B x 2 (del kit)	20,00
Cebador directo de Tata (20 µM)	0,50
Imai-LTR-Rev (20 µM)	0,50
Sonda para TAR (5 µM) con marcador FAM	0,60

50

Tabla 10 Mezcla maestra 2 para PCR para la detección de ADN de Cal-1, las cantidades totales fueron de 34 microlitros.

agua sin ADNasa ARNasa	12,40
B x 2 (del kit)	20,00
NuAf (20 µM)	0,50
Imai-LTR-Rev (20 µM)	0,50
sonda de Cal-1 (5 µM) con marcador Cy5	0,60

Tabla 11 Mezcla maestra 3 para PCR para la detección de actina, las cantidades totales fueron de 17 microlitros

agua sin ADNasa ARNasa	6,20
B x 2 (del kit)	10,00
Cebador directo de Actina (20 µM)	0,25
Cebador inverso de Actina (20 µM)	0,25
Sonda de actina (5 µM) con FAM	0,30

5 Se dispensó una alícuota de 34 µl de Mezcla maestra 1 (detección de VIH-1) y de Mezcla maestra 2 (detección de Cal-1) en cada pocillo de una placa de 96 pocillos de la posición designada como en un formato de ensayo a continuación, y se dispensó una alícuota de 16 µl de Mezcla maestra 3 (detección de Actina) en cada pocillo de una placa de 96 pocillos distinta, como en un formato de ensayo a continuación (véanse las FIG. 15D y 15E).

10 Después de la adición de 6 µl de los patrones de VIH-1 y Cal-1, y de las muestras de prueba para cada pocillo de la posición designada y 3 µl de patrones de Actina y de las muestras de prueba para cada pocillo de la posición designada. Se realizó PCR utilizando la siguiente condición: 95 °C-2 min 45 ciclos de (94 °C-7 s, 60 °C-30 s)

Reactivos

15 Kit SentiFast Probe (Line N.º de Cat BIO-86005) Patrones

Patrones de VIH-1: 0, 4, 4x10, 4x102, 4x103, 4x104, 4x105, 4x106 copias/µl

Patrones de Cal-1: 0, 2, 2x10, 2x102, 2x103, 2x104, 2x105, 2x106 copias/µl

20 Patrones de Actina: 0, 2, 2x10, 2x102, 2x103, 2x104, 2x105, 2x106 copias/µl

Los datos de ADN integrado de VIH-1 se normalizaron con 106 copias de Actina (Figura 8A).

Análisis

25 El análisis de los linfocitos CD4 no transducidos mostró que este ensayo detectó dos células U1 adicionadas a 1x10⁶ células CD4, así como también se detectaron 20, 200 y 2000 células U1. Se detectó un número de copias de ADN de VIH-1 aumentado de forma lineal con respecto a la proporción de la cantidad de células U1 adicionada.

30 En el análisis de los linfocitos CD4 transducidos con Cal-1 (MOI de 2), los resultados mostraron que las 2, 20, 200, 2000 células U1 adicionadas se detectaron de forma lineal.

35 En el análisis de los linfocitos CD4 transducidos con Cal-1 (MOI de 10), los resultados mostraron que las 2, 20, 200, 2000 células U1 adicionadas también se detectaron de forma lineal.

El valor detectado de VIH-1 en el análisis de 2, 20, 200, 2000 células U1 mostró datos equivalentes en los tres grupos, indicando que el ADN integrado de Cal-1 no interfirió con la detección del VIH-1 (Figura 8A).

40 Los datos de ADN integrado de Cal-1 se normalizaron con 106 copias de Actina (Figura 8B).

El ensayo de ADN de Cal-1 no detectó ADN de Cal-1 en los linfocitos CD4 no transducidos, a pesar de la adición de células U1 en los linfocitos CD4.

45 Se observó una detección consistente de nivel de ADN de Cal-1 para el análisis de linfocitos CD4 transducidos con Cal-1 (MOI de 2)".

También se observó una detección consistente de nivel de ADN de Cal-1 para el análisis de "linfocitos CD4 transducidos con Cal-1 (MOI de 10)". El valor detectado de Cal-1 con MOI=10 fue aproximadamente 50 veces mayor que el de Cal-1 con MOI=2, indicando más integración del ADN de Cal-1 en los linfocitos T CD4+.

50 Conclusión

- 1) El ensayo de VIH-1 es lo suficientemente sensible como para detectar ADN de VIH-1 obtenido de 1 ml de sangre de los pacientes (14 de 14 muestras positivas para VIH-1)
- 55 2) El ensayo de Cal-11 no tuvo ninguna reactividad cruzada con el ADN extraído de VIH-1 Ejemplo 6

Se analizaron tres muestras:

- 60 1. Células CD4 no transducidos
2. CD4 transducidos con Cal-1-lenti a una MOI de 2

3. CD4 transducidos con Cal-1-lenti a una MOI de 10

Estas muestras se prepararon a partir del mismo donante.

- 5 La Muestra número 1 es el control negativo del experimento, La Muestra número 2 es de linfocitos CD4+ transducidos Cal-1 con una MOI de 2, y la Muestra número 3 es de linfocitos CD4+ transducidos Cal-1 con una MOI de 10. Estas muestras se obtuvieron el día 14 después de la transducción de los linfocitos CD4 con Cal-1-lenti.

10 OBJETIVOS

- 10 A) La evaluación del nuevo ensayo basado en regiones LTR es capaz de detectar ADN integrado de CAL-1 utilizando muestras de donantes reales.
 B) La comprobación de un número de copias incrementado del nivel de ADN integrado de CAL-1 con células transducidas a MOI más altas.
 15 C) La comprobación de la reactividad cruzada del ensayo de VIH-1: El ensayo de LTR de VIH-1 no debe detectar ningún nivel de VIH en las muestras clínicas, que solo tienen ADN integrado de CAL-1, ya que estas muestras no tienen infección por VIH-1.
 D) La comprobación del desempeño del control interno: El establecimiento de los controles internos es importante para evaluar la validación del ensayo para el análisis de muestras real.

20 Tres controles internos:

- N.º 1 <MOLT4 con Cal-1> Las células MOLT4 se transdujeron con Cal-1
 N.º 2 <80 % MOLT4 20 % MOLT4-Cal-1> El grado de células transducidas se determinó por análisis de flujo de la expresión de C46. Esta configuración experimental es para el efecto transgénico de una población mixta de células MOLT-4 originales (80 %) y células MOLT-4 transducidas Cal-1 (20 %).
 25 N.º 3 <MOLT4 (sin Cal-1)> Células MOLT4 solas, sin ninguna transducción de Cal-1

30 Estos tres grupos de muestras se infectaron con VIH-1 BaL. Se prepararon muestras de ADN después de 14 días de infección de MOLT-4.

Resultados (Tablas 12, 13 y 14), que muestran los resultados del experimento que permite la identificación del número de copias de ADN de VIH-1 y Cal-1 utilizando un ensayo de dos tubos distintos (Método-2).

35 Ensayo de VIH-1

El patrón de VIH mostró una buena detección lineal del ADN de VIH-1, de 4-4.000.000 copias/μl

- 40 Tres muestras del mismo donante no mostraron detección de ADN de VIH-1: (a) el control N.º 1 <MOLT4 con Cal-1> no mostró VIH; (b) el control N.º 2 <80 % MOLT4 20 % MOLT4-Cal-1> mostró cierto nivel de detección de VIH; (c) control N.º 3 <MOLT4 sin Cal-1> mostró niveles mucho más altos de detección de VIH.

Ensayo de Cal-1

- 45 El patrón de Cal-1 mostró una buena detección lineal del ADN de Cal-1, de 2-2.000.000 copias/μl: (a) JE n.º 1-3 no muestran integración de Cal-1; (b) JE n.º 1-3 transducidas con MOI=2 muestran 70,5 copias de integración de Cal-1; (c) JE n.º 1-3 transducidas con MOI=10 muestran 160 copias de integración de Cal-1, lo que es el doble del valor que con MOI de 2; (d) control N.º 1 <MOLT4 con Cal-1> mostró un alto nivel de 773 copias de ADN de CAL-1; (d) control N.º 2 <80 % MOLT4 20 % MOLT4-Cal-1> mostró un nivel mucho más bajo de copias de ADN de CAL-1; (e)
 50 control N.º 3 <MOLT4 sin Cal-1> no mostró niveles altos de detección de Cal-1.

Conclusiones

- 55 A) El nuevo ensayo basado en regiones LTR puede detectar ADN integrado de CAL-1 utilizando muestras clínicas reales con el mismo donante.
 B) El nuevo ensayo es capaz de detectar un número aumentado de copias del nivel de ADN integrado de CAL-1 con células transducidas con una MOI más alta, mediante la comparación de datos con MOI de 2 y con MOI de 10.
 C) El nuevo ensayo basado en la región LTR de VIH-1 no muestra ninguna reactividad cruzada del ADN integrado de CAL-1 en las muestras.
 60 D) Los tres nuevos controles internos funcionan muy bien en la evaluación de este nuevo ensayo. Estos tres controles son útiles para cada ejecución del análisis de Cal-1 y VIH-1.

- 65 En cuanto al ensayo de VIH-1: (a) Los números de copias de VIH-1 en las muestras se calcularon mediante patrones de VIH-1; (b) El número de copias de VIH-1 se normalizó mediante el número de copias de ADN de ACTINA en el mismo ADN extraído, Los números de copias de VIH normalizados se calculan mediante 1000 copias de Actina, lo

que se resalta con una letra azul en la última columna.

En cuanto al ensayo de Cal-1: (a) los números de copias de Cal-1 en las muestras se calcularon mediante patrones de Cal-1; (b) el número de copias de Cal-1 se normalizó mediante el número de copias de ADN de ACTINA en el mismo ADN extraído, Los números de copias de CAL-1 normalizados se calcularon mediante 1000 copias de Actina, lo que se resalta con una letra azul en la última columna.

En cuanto al ensayo de Actina: (a) los números de copias de actina en las muestras se calcularon mediante patrones de Actina; (b) estos números de copias se utilizaron para la normalización del número de copias de VIH-1 y Cal-1 en las muestras.

La Tabla 12 proporciona: los números de copias de VIH-1 en las muestras, calculados mediante los patrones de VIH-1; el número de copias de VIH-1 se normalizó mediante el número de copias de ADN de ACTINA en el mismo ADN extraído. Los números de copias de VIH normalizados se calcularon mediante 1000 copias de Actina, lo que se enumera en la última columna. Nota: El valor de cp (ciclo de PCR de punto de cruce) es el ciclo en el que la fluorescencia alcanzó un umbral definido. El patrón de VIH mostró una buena detección lineal del ADN de VIH-1, de 4-4.000.000 copias/μl. Tres muestras con el mismo donante (no transducida, transducida con MOI de 2, transducida con MOI de 10) no mostraron detección de ADN de VIH-1. El control interno N.º 1 <MOLT4 con Cal-1 > con muestras infectadas por VIH no mostraron VIH. El control interno N.º 2 <80 % MOLT4 20 % MOLT4-Cal1> con muestras infectadas por VIH mostró cierto nivel de detección de VIH. El control interno N.º 3 <MOLT4 sin Cal1> con muestras infectadas por VIH mostró niveles muchos más altos de detección de VIH.

La Tabla 13 proporciona datos del análisis de Cal-1. Los números de copias de Cal-1 en las muestras se calcularon mediante patrones de Cal-1. El número de copias de Cal-1 se normalizó mediante el número de copias de ADN de ACTINA en el mismo ADN extraído. Los números de copias de CAL-1 normalizados se calcularon mediante 1000 copias de Actina, lo que se enumera en la última columna. El patrón de Cal-1 mostró una buena detección lineal del ADN de Cal-1, de 2-2.000.000 copias/μl. JE n.º 1-3 no transducidas no mostraron integración de CAL1. JE n.º 1-3 transducidas con MOI=2 mostraron 70,5 copias de integración de CAL1. JE n.º 1-3 transducidas con MOI=10 mostraron 160 copias de integración de CAL1, lo que es el doble del valor que en MOI de 2. El control interno N.º 1 <MOLT4 con Cal1> con la muestra infectada por VIH, mostró un alto nivel de 773 copias ADN de CAL1. El control interno N.º 2 <80 % MOLT4 20 % MOLT4-Cal1> con muestras infectadas por VIH mostró un nivel mucho más bajo de copias de ADN de CAL1. El control interno N.º 3 <MOLT4 sin Cal1> con muestras infectadas por VIH no mostró niveles de detección de Cal-1.

La Tabla 14 proporciona datos del análisis de Actina. Los números de copias de actina en las muestras se calcularon mediante patrones de Actina. Estos números de copias se utilizaron para la normalización del número de copias de VIH-1 y Cal-1 en las muestras.

Tabla 12 Ensayo de Actina, CAL, VIH

Posición	Nombre	Cp	Concentración de VIH-1	Actina	Copias de VIH-1 por 10 (3) copias de Actina
A2	CN		0		
B2	Patrón de VIH	38,22	4		
C2	Patrón de VIH	33,21	40		
D2	Patrón de VIH	29,88	400		
E2	Patrón de VIH	27,44	4000		
F2	Patrón de VIH	23,41	40000		
G2	Patrón de VIH	20,33	400000		
H2	Patrón de VIH	16,73	4000000		
A3	<JE n.º 1-3 no transducidas> utilizando 5×10^5		0	11137166	0
B3	<JE n.º 1-3 transducidas con MOI=2> 5×10^6		0	8705100	0
C3	<JE n.º 1-3 transducidas con MOI=10> 5×10^5		0	3901724	0
D3	Control N.º 1 <MOLT4 con Cal1> con VIH día 14		0	44498	0
E3	Control N.º 2 <80 % MOLT4 20 % MOLT4-Cal1> con VIH día 14	25,57	10598	67407	157
F3	Control N.º 3 <MOLT4 (sin Cal1)> con VIH día 14	22,35	90697	86849	1.044

Tabla 13 Ensayo de Actina, CAL, VIH

Posición	Nombre	Cp	Concentración de Cal-1	Actina	Copias de Cal-1 por 10 (3) copias de Actina
A5	CN		0		
B5	Patrón de Cal	37,7	2		
C5	Patrón de Cal	36,8	20		
D5	Patrón de Cal	34,13	200		
E5	Patrón de Cal	30,76	2000		
F5	Patrón de Cal	27,48	20000		
G5	Patrón de Cal	23,6	200000		
H5	Patrón de Cal	20,45	2000000		
A6	<JE n.º 1-3 no transducidas> utilizando 5×10^6			11137166	0,0
B6	<JE n.º 1-3 transducidas con MOI=2> 5×10^6	22,6	613511	8705100	70,5
C6	<JE n.º 1-3 transducidas con MOI=10> 5×10^6	22,58	622911	3901724	159,7
D6	Control N.º 1 <MOLT4 con Cal1> con VIH día 14	26,39	34388	44498	772,8
E6	Control N.º 2 <80 % MOLT4 20 % MOLT4-Cal1> con VIH día 14	32,29	388	67407	5,7
F6	Control N.º 3 <MOLT4 (sin Cal1)> con VIH día 14		0	86849	0,0

Tabla 14 Ensayo de Actina, CAL, VIH

Posición	Nombre	Cp	Concentración de actina
A8	CN		0
B8	Patrón de actina	39,56	2
C8	Patrón de actina	39,56	20
D8	Patrón de actina	34,78	200
E8	Patrón de actina	30,85	2000
F8	Patrón de actina	28,03	20000
G8	Patrón de actina	24,26	200000
H8	Patrón de actina	21,48	2000000
A9	<JE n.º 1-3 no transducidas> utilizando 5×10^6	18,97	11137166
B9	<JE n.º 1-3 transducidas con MOI=2> 5×10^6	19,32	8705100
C9	<JE n.º 1-3 transducidas con MOI=10> 5×10^6	20,46	3901724
D9	Control N.º 1 <MOLT4 con Cal1> con VIH día 14	26,81	44498
E9	Control N.º 2 <80 % MOLT4 20 % MOLT4-Cal1> con VIH día 14	26,22	67407
F9	Control N.º 3 <MOLT4 (sin Cal1)> con VIH día 14	25,86	86849

5

Ejemplo 7

Se prepararon tres conjuntos de muestras basados en un modelo de infección de MOLT-4. La Figura 10 proporciona gráficos que muestran la eficacia de transducción en células MOLT-4 (Fig. 10A) y análisis de sobrenadantes de cultivo para detectar la cantidad de virus VIH-1 liberado de las células MOLT-4 infectadas por VIH-1 mediante ensayo de RT (Fig. 10B, C), y mediante análisis de PCR en tiempo real (RT) de transcriptasa inversa de una etapa (Fig. 10D).

Se prepararon tres conjuntos de muestras basadas en células MOLT-4 para observar el impacto de la protección de Cal-1 frente a la infección por VIH-1.

- A) Células MOLT-4 solas sin transducción de vector lentivírico Cal-1;
- B) células MOLT-4 transducidas con el vector lenti-ccr5;
- C) Células MOLT-4 transducidas con el lenti-vector Cal-1.

20

Las células MOLT-4 se transdujeron con lenti-sh5 y lenti-Cal-1 con una MOI de 2,5. La transducción se determinó después de una incubación de 48 horas, utilizando tinción de 2F5 y ccr5 en células MOLT-4 con análisis de

citometría de flujo.

La Figura 10A proporciona un análisis de flujo de células MOLT-4 con lenti-ccr5 y Cal-1 (ccr5 y C46). Las células MOLT-4 transducidas solo con Lenti-ccr5 indicaron una reducción del 75 % en la expresión de CCR5. Los datos de las células MOLT-4 transducidas con Lenti-Cal-1 revelaron que aproximadamente el 89 % de las células expresaron C46 y también se observó una reducción de aproximadamente el 68 % en la expresión de CCR5.

La Figura 10B proporciona un ensayo de transcriptasa inversa de MOLT4 con lenti-ccr5 y de MOLT4 con Cal-1, después de la infección por VIH-1, utilizando ensayos de dos tubos distintos en conformidad con el Método 2. 48 horas postransducción, las células MOLT4 se infectaron con BaL a una MOI de 0,2. 7 días postransducción, se analizó la actividad de transcriptasa inversa en el sobrenadante de cultivo. La combinación de CCR5 y el inhibidor de la fusión C46 (Cal-1) mostró una supresión significativa de la actividad de la transcriptasa inversa en comparación con la de las células MOLT4 transducidas con lenti-ccr5 y las células MOLT4 no transducidas.

Los inventores configuraron otros tres conjuntos de muestras que se prepararon basándose en células MOLT-4, que eran idénticos a las configuraciones experimentales descritas en el Ejemplo 1, para confirmar los datos anteriores con este experimento repetido.

a. Células MOLT-4 solas sin transducción de lentivirus Cal-1;

b. 80 % de células MOLT-4 y 20 % de células MOLT-4 con transducción de lentivirus Cal-1. El grado de células transducidas se determinó mediante análisis de citometría de flujo de expresión de C46. Esta configuración experimental es para el efecto transgénico de una población mixta de células MOLT-4 originales (80 %) y células MOLT-4 transducidas Cal-1 (20 %);

c. MOLT4 con Cal-1 (100 %). El 100 % de las células se transdujeron con Cal-1 según lo determinado por la expresión de C46 en citometría de flujo.

El procedimiento experimental fue el mismo que en el Ejemplo 1 en el presente documento. En resumen, aproximadamente 0,5 millones de estas células estaban infectadas con VIH-1 BaL. Estas células se cultivaron en un matraz de cultivo de 25 cm² utilizando 10 ml de un medio basado en RPMI-1640 convencional que contenía SFB al 10 %, con suplemento de glutamax IX en un incubador de CO₂. Se tomaron muestras de sobrenadante de cultivo (1 ml) en el día 4, 7, 10, 14 para el análisis tanto del ensayo de RT (Fig. 10C) así como del ensayo de PCR en tiempo real (RT) de transcriptasa inversa (Fig. 10D). Las muestras de células cultivadas también se prepararon en los días 4, 7, 10, 14 para análisis de análisis intracelulares de ADN (Fig. 11AB) y de ARN (Fig. 12AB). En cada punto de tiempo, se transfirieron 0,6 ml de la suspensión de células cultivadas para el análisis de ADN y 0,4 ml de la suspensión de células cultivadas para análisis de ARN a tubos Eppendorf de 2,0 ml convencionales. Estos tubos se centrifugaron a 900 g durante 3 min. Se eliminó el sobrenadante. Se añadió un ml de PBS a cada tubo, seguido de centrifugación a 900 g durante 3 min. Se eliminó el sobrenadante. Los sedimentos celulares se utilizaron para análisis de ARN y ADN.

La Figura 10C proporciona datos de la evolución temporal de un ensayo de transcriptasa inversa de tres condiciones: (a) MOLT4 transducidas con Cal-1; (b) el 80 % de MOLT4 no transducidas mezcladas con el 20 % de transducidas con Cal-1; y (c) el control simulado. Los datos revelan que se observó una reducción de más de 2 log en la actividad de transcriptasa inversa observada en células MOLT4 transducidas con Cal-1 en el día 14, en comparación con un cultivo mixto del 20 % de células MOLT4 transducidas con Cal-1 y el 80 % no transducidas, y células MOLT4 no transducidas (control simulado) en el día 14.

Se utilizó el ensayo de transcriptasa inversa (ensayo de RT) (Figura 10C) para medir la cantidad de VIH-1 en 10 µl de sobrenadante de cultivo, liberado de MOLT-4 infectadas (Suzuki K, *et al*: Poly A-linked non-isotopic microtiter plate reverse transcriptase assay for sensitive detection of clinical human immunodeficiency virus isolates. J Virol Methods 1995, 55:347-356).

La Figura 10D proporciona un gráfico que muestra los resultados del experimento que permite la identificación del número de copias de ARN de VIH-1 con el Método 2, utilizando 500 µl de sobrenadante de cultivo. Se extrajo ARN de sobrenadante de cultivo utilizando un sistema de extracción automatizado (EasyMag, bioMerieux), con una configuración de 60 µl de volumen de elución.

El LightCycler-480 (Roche) y la placa blanca de 96 pocillos para LightCycler-480 se utilizaron en un análisis de PCR en tiempo real de transcriptasa inversa en una etapa.

Se elaboró una mezcla maestra por protocolo para 8 patrones y el análisis de muestras (véase la Tabla 15).

Tabla 15 Mezcla maestra para PCR para la detección de ARNm de VIH-1, en que el volumen total de la mezcla era de 34 microlitros.

agua sin ADNasa ARNasa	11,20
B x 2 (del kit)	20,00

(continuación)

Cebador directo de Tata 20 µM)	0,50
Imai-LTR-Rev (20 µM)	0,50
sonda de Tata de VIH-1 (5 µM) con marcador FAM	0,60
enzima RT (del kit)	0,40
Inhibidor de ARNasa (del kit)	0,80

Se dispensó una alícuota de 34 µl de Mezcla maestra en cada pocillo de una placa de 96 pocillos.

5 Después de la adición de 6 µl de patrones y de muestras en cada pocillo en la posición designada.

La RT-PCR se inició con la siguiente condición: 45 °C-20 min, 95 °C-2 min 45 ciclos de (94 °C -7 s, 60 °C-30 s)

Reactivos

10 Kit SensiFAST Probe One step (BioLine n.ºBIO-76005)

Patrones

15 Patrones de VIH-1: 0, 4, 4x10, 4x102, 4x103, 4x104, 4x105, 4x106 copias/µl

La Figura 10D proporciona datos de la evolución temporal para el análisis de PCR en tiempo real (RT) de transcriptasa inversa de una etapa. Los datos de RT previos se confirmaron mediante este ensayo de PCR en tiempo real basado en TaqMan. La figura revela que se observó una reducción de más de 2 log del ARN de VIH-1 extraído del sobrenadante de cultivo de células MOLT4 transducidas con Cal-1 en el día 14, en comparación con los datos de un cultivo mixto del 20 % de células MOLT4 transducidas con Cal-1 y el 80 % no transducidas, y células MOLT4 no transducidas (control simulado).

25 Nota: No se realizó el ensayo de Cal-1 para estas muestras. Para estas muestras solo se realizó una detección específica de VIH-1.

Ejemplo 8

30 Las Figuras 11A y 11B proporcionan gráficos que muestran los resultados de experimentos que permiten la identificación del número de copias del ADN de VIH-1 y del ADN de Cal-1 utilizando ensayos de dos tubos distintos en conformidad con el Método 2.

35 Se extrajo el ADN de los sedimentos celulares preparados en los días 4, 7, 10, 14 utilizando kits PurLink Genomic DNA (ThermoFisher) con 60 µl de volumen de elución.

Nota: En este análisis de PCR en tiempo real en una etapa se utilizaron LightCycler 480 (Roche) y la placa blanca de 96 pocillos para LightCycler-480.

40 Se elaboraron tres mezclas maestras por protocolo para 8 patrones y el análisis de muestras (véanse las Tablas 16, 17 y 18).

- i) La Mezcla maestra 1 es para la detección de ADN de VIH-1
- ii) La Mezcla maestra 2 es para la detección de ADN de Cal-1
- 45 iii) La Mezcla maestra 3 es para la detección de la detección de Actina

Tabla 16 Mezcla maestra 1 para PCR para la detección de ADN de VIH-1, en que el volumen total de la mezcla era de 34 microlitros.

agua sin ADNasa ARNasa	12,40
B x 2 (del kit)	20,00
Cebador directo de Tata (20 µM)	0,50
Imai-LTR-Rev (20 µM)	0,50
Sonda para TAR (5 µM) con marcador FAM	0,60

Tabla 17 Mezcla maestra 2 para PCR para la detección de ADN de Cal-1, en que el volumen total de la mezcla era de 34 microlitros.

agua sin ADNasa ARNasa	12,40
B x 2 (del kit)	20,00
NuAf (20 µM)	0,50
Imai-LTR-Rev (20 µM)	0,50
sonda de Cal-1 (5 µM) con marcador Cy5	0,60

5 Tabla 18 Mezcla maestra 3 para PCR para la detección de actina, en que el volumen total de la mezcla era de 17 microlitros.

agua sin ADNasa ARNasa	6,20
B x 2 (del kit)	10,00
Cebador directo de Actina (20 µM)	0,25
Cebador inverso de Actina (20 µM)	0,25
Sonda de actina (5 µM) con FAM	0,30

10 Se dispensó una alícuota de 34 µl de Mezcla maestra 1 en cada pocillo de una placa de 96 pocillos, en la posición designada del pocillo. Se dispensó una alícuota de 34 µl de Mezcla maestra 2 en cada pocillo de una placa de 96 pocillos y se dispensó una alícuota de 17 µl de Mezcla maestra 3 en cada pocillo de la placa de 96 pocillos.

Después de la adición de 6 µl de los patrones y las muestras a cada pocillo de la Mezcla maestra 1 y la maestra 2, y de la adición de 3 µl de patrones y muestras a cada pocillo de la Mezcla maestra 3

15 La PCR se inició con la siguiente condición: 95 °C-2 min 45 ciclos de (94 °C-7 s, 60 °C-30 s)

Reactivos

Kit SentiFast Probe (Line N.º de Cat BIO-86005)

20

Patrones

Patrones de VIH-1: 0, 4, 4x10, 4x102, 4x103, 4x104, 4x105, 4x106 copias/µl

25 Patrones de Cal-1: 0, 2, 2x10, 2x102, 2x103, 2x104, 2x105, 2x106 copias/µl

Patrones de Actina: 0, 2, 2x10, 2x102, 2x103, 2x104, 2x105, 2x106 copias/µl

30 Los datos de ADN integrado de Cal-1 y de ADN integrado de VIH-1 se normalizaron con 1000 copias de Actina (Figura 11AB).

35 La Figura 11A ilustra los resultados de la detección de Cal-1 de acuerdo con las realizaciones de la presente divulgación. El ADN integrado de Cal-1 se amplificó mediante un método de PCR de ADN basado en TaqMan basado en los métodos de ensayo ilustrados en la Figura 3, divulgados en el presente documento. La PCR de ADN en tiempo real se realizó con el ADN extraído de tres conjuntos de experimentos de infección basados en MOLT4. Los datos muestran que se detectó una presencia consistente de niveles de ADN integrado de Cal-1 (normalizados mediante Actina) en células MOLT4 transducidas con Cal-1 durante todo el experimento desde el día 4 hasta el día 14. El ADN de Cal-1 no se detectó en las células MOLT4 (control simulado). Se observó una reducción significativa del nivel de ADN integrado de Cal-1 en un cultivo mixto del 20 % de células MOLT4 transducidas con Cal-1 y el 80 % sin transducir, como es evidente en los días 4 y 7. Hacia los días 10 y 14, estos niveles se habían reducido aún más hasta un nivel indetectable. Los números de copias de Cal-1 se normalizaron con 1000 copias de DNA de Actina.

45 La Figura 11B ilustra los resultados de la detección de VIH-1 de acuerdo con las realizaciones de la presente divulgación. Se observó una reducción de más de 3 log en el nivel integrado de ADN de VIH-1 en las células MOLT4 transducidas con Cal-1 en comparación con la de las células MOLT4 no transducidas durante el día 4 al día 14 después de la infección por VIH-1. Estos datos confirman la protección de células MOLT4 frente a la infección por VIH-1 después de la transducción del vector lentivírico Cal-1. Nivel elevado de ADN de VIH-1 en un cultivo mixto del 20 % de células MOLT4 transducidas con Cal-1 y el 80 % no transducidas en el día 10 y el día 14, en comparación con los del día 4 y el día 7. Los datos de ADN de Cal-1 en un cultivo mixto del 20 % de células MOLT4 transducidas con Cal-1 y el 80 % no transducidas el día 10 y el día 14 sugirieron la pérdida de ADN de Cal-1 integrado en esos puntos de tiempo. Por lo tanto, se observó un aumento de los niveles de ADN de VIH-1 en un cultivo mixto el día 10 y el día 14. Los datos también sugieren que el transgén Cal-1 funciona protegiendo frente a la infección por VIH-1. Los números de copias de VHI-1 se normalizaron con 1000 copias de DNA de Actina.

Ejemplo 9

La Figura 12A proporciona gráficos que muestran los resultados de los experimentos que permiten la identificación del número de copias de ARN de VIH-1 con el Método 2. Para detectar el nivel de ARN intercelular de VIH-1, se analizó el ARNm de LTR específico de VIH-1 (Figura 12A). Se extrajo ARN de los sedimentos celulares preparados en los días 4, 7, 10, 14, utilizando el sistema ReliaPrep RNA Miniprep (Promega) con 60 μ l de volumen de elución.

Nota: LightCycler 480 y la placa blanca de 96 pocillos para LightCycler-480 se utilizaron en este análisis de análisis de PCR en tiempo real (RT) de transcriptasa inversa de una etapa.

Se hicieron dos mezclas maestras por protocolo para 8 patrones y el análisis de muestras (véanse las Tablas 19 y 20).

Mezcla maestra 1 para PCR: La mezcla maestra es para la detección de ARNm de VIH-1.

Mezcla maestra 2 para PCR: La mezcla maestra es para la detección de ARNm de GAPDH.

Tabla 19 Mezcla maestra 1 para PCR para la detección de ARNm de VIH, en que la mezcla tenía un volumen total de 34 microlitros.

agua sin ADNasa ARNasa	11,20
B x 2 (del kit)	20,00
NuAf (20 μ M)	0,50
Imai-LTR-Rev (20 μ M)	0,50
sonda de Tata de VIH-1 (5 μ M) con marcador FAM	0,60
enzima RT (del kit)	0,40
Inhibidor de ARNasa (del kit)	0,80

Tabla 20 Mezcla maestra 2 para PCR para la detección de ARNm de GAPDH, en que la mezcla tenía un volumen total de 17 microlitros.

agua sin ADNasa ARNasa	5,60
B x 2 (del kit)	10,00
Cebador directo de GAPDH (20 μ M)	0,25
Cebador directo de GAPDH (20 μ M)	0,25
Sonda Taq para GAPDH (5 μ M), marcador Cy5	0,30
enzima RT (del kit)	0,20
Inhibidor de ARNasa (del kit)	0,40

Se dispensó una alícuota de 34 μ l de Mezcla maestra 1 en cada pocillo de una placa de 96 pocillos y se dispensó una alícuota de 17 μ l de Mezcla maestra 2 en cada pocillo de la placa de 96 pocillos en la posición designada del pocillo.

Después de la adición de 6 μ l de los patrones y las muestras a cada pocillo de la Mezcla maestra 1 y de la adición de 3 μ l de patrones y muestras a cada pocillo de la Mezcla maestra 2. La PCR se inició con la siguiente condición: 45 °C-20 min 95 °C-2 min 45 ciclos de (94 °C -7 s, 60 °C-30 s)

Reactivos

Kit SensiFAST Probe One step (BioLine n.ºBIO-76005)

Patrones

Patrones de VIH-1: 0, 4, 4x10, 4x102, 4x103, 4x104, 4x105, 4x106 copias/ μ l

Patrones de GAPDH: 0, 2, 2x10, 2x102, 2x103, 2x104, 2x105, 2x106 copias/ μ l

Los datos del análisis de ARNm de VIH-1 se normalizaron con 106 copias de la expresión de ARNm de GAPDH (Figura 12A).

Ejemplo 10

Se prepararon dos conjuntos de muestras basándose en un modelo de infección de CMSP. Los sobrenadantes de cultivo se analizan para detectar la cantidad de virus VIH-1 liberado de las CMSP infectadas con VIH-1 mediante ensayo de RT (Fig. 13A) y mediante un análisis de PCR en tiempo real (RT) de transcriptasa inversa de una etapa (Fig. 13B).

Se prepararon dos conjuntos de muestras basadas en CMSP, para observar el impacto de la protección de Cal-1 frente a la infección por VIH-1.

5 A) CMSP solas sin transducción de vector lentivírico Cal-1.

B) CMSP transducidas con el vector lentivírico Cal-1.

10 Las CMSP se prepararon mediante un único donante sano. Se utilizó un método convencional de estimulación con PHA para estimular las CMSP durante 3 días precultivo, seguido de la transducción con lenti-Cal-1 con una MOI de 2,5.

15 El procedimiento experimental fue el siguiente. Tres millones de CMSP transducidas y CMSP solas sin transducción se infectaron con VIH-1 BaL. Estas células se cultivaron en una placa de cultivo de 6 pocillos utilizando 4 ml de un medio basado en RPMI-1640 convencional que contenía SFB al 10 %, con suplemento de glutamax IX en un incubador de CO₂. Se tomaron muestras de sobrenadante de cultivo (1 ml) en el día 4, 7, 10, 14 para el análisis tanto del ensayo de RT (Fig. 13A) así como del ensayo de PCR en tiempo real (RT) de transcriptasa inversa (Fig. 13B). Las muestras de células cultivadas también se prepararon en los días 4, 7, 10, 14 para análisis de análisis intracelulares de ADN (Fig. 14AB) y de ARN (Fig. 14C). En cada punto de tiempo, se transfirieron 0,6 ml de la suspensión de células cultivadas para el análisis de ADN y 0,4 ml de la suspensión de células cultivadas para análisis de ARN a tubos Eppendorf de 2,0 ml convencionales. Estos tubos se centrifugaron a 900 g durante 3 min. Se eliminó el sobrenadante. Se añadió un ml de PBS a cada tubo, seguido de centrifugación a 900 g durante 3 min. Se eliminó el sobrenadante. Los sedimentos celulares se utilizaron para análisis de ARN y ADN.

25 La Figura 13B ilustra un análisis de PCR en tiempo real de transcriptasa inversa sobre ARN en sobrenadantes de cultivo en conformidad con el Método 2. Los datos de transcriptasa inversa en la Figura 14a se confirmaron mediante un ensayo de PCR- transcriptasa inversa en tiempo real basado en TaqMan utilizando el ARN extraído del sobrenadante de cultivo. Se observó una reducción de cinco veces en el ARN de VIH-1 del sobrenadante de cultivo de las CMSP transducidas con Cal-1 el día 7 y el día 10, en comparación con las CMSP no transducidas (control simulado).

30 Se utilizó el ensayo de transcriptasa inversa (ensayo de RT) (Figura 13C) para medir la cantidad de VIH-1 en 10 µl de sobrenadante de cultivo, liberado de CMSP infectadas (Suzuki K, *et al*: Poly A-linked non-isotopic micro titer plate reverse transcriptase assay for sensitive detection of clinical human immunodeficiency virus isolates. J Virol Methods 1995, 55:347-356).

35 La Figura 13A ilustra los datos de un ensayo de transcriptasa inversa basados en las CMSP de un donante sano. Se observó un nivel de reducción de más de 5 veces de la actividad de la transcriptasa inversa en las CMSP transducidas con Cal-1 después de la infección por VIH-1, en el día 4 y el día 7, comparado con el de las CMSP no transducidas.

40 Aunque la divulgación en el presente documento se ha descrito con referencia a realizaciones particulares, ha de entenderse que estas realizaciones son meramente ilustrativas de los principios y aplicaciones de la presente divulgación. Por lo tanto, debe entenderse que pueden realizarse numerosas modificaciones a las realizaciones ilustrativas y que pueden idearse otras disposiciones, sin alejarse del ámbito de la presente invención, como se define en las reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SEQUENCIAS

50 <110> ST. VINCENT'S HOSPITAL SYDNEY LIMITED
CALIMMUNE, INC.
CALIMMUNE AUSTRALIA PTY LTD
NEWSOUTH INNOVATIONS PTY LIMITED
55 KELLEHER, Anthony Dominic
SYMONDS, Geoffrey Phillip
SUZUKI, Kazuo

<120> MÉTODOS DE DISCRIMINACIÓN ENTRE EL VIH-1 Y VECTORES DE LENTIVÍRICOS

60 <130> Cal-004WO

<150> US 62/163.327

<151> 18/05/2015

65 <160> 17

ES 2 784 351 T3

<170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 24
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintético: secuencia dentro de la región U3 con la que hibrida el cebador NuAf
 10 <400> 1
 ggtttcttct gttctatagg aact 24
 <210> 2
 15 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> Sintético: Cebador NuAf
 <400> 2
 ccaaagaaga caagatatcc ttgac 25
 25 <210> 3
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Sintético: secuencia dentro de la región U3 con la que hibrida el cebador TATA
 <400> 3
 35 gacgaatata cgctgtagac tc 22
 <210> 4
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Sintético: cebador TATA
 <400> 4
 45 ctcatatgct gcatataagc ag 22
 <210> 5
 <211> 18
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintético: secuencia dentro de la región R con la que hibrida el cebador LTR-rev
 55 <400> 5
 ccaactgctta agcctcaa 18
 <210> 6
 <211> 18
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintético: Cebador LTR-rev
 65 <400> 6

ES 2 784 351 T3

	ttgaggctta agcagtgg	18
5	<210> 7 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Sintético: secuencia dentro de la 3'LTR con la que hibrida la sonda para TAR	
	<400> 7 aatctggtct agactcggac cctcgagag	29
15	<210> 8 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Sintético: Sonda para TAR	
	<400> 8 ttagaccaga tctgagcctg ggagctctc	29
25	<210> 9 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Sintético: secuencia dentro de la 3'LTR con la que hibrida la sonda para TATA	
35	<400> 9 gccctcagat cctgcatata agcag	25
40	<210> 10 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Sintético: Sonda para TATA	
45	<400> 10 ctgcttatat gcaggatctg agggc	25
50	<210> 11 <211> 5 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Sintético: Secuencia de la caja TATA	
55	<400> 11 tataa	5
60	<210> 12 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> Sintético: Secuencia dentro de la región U3 en la que hibrida la sonda de unión	
	<400> 12	

ES 2 784 351 T3

```

cgacgtaggc ctgacatgac c                               21

<210> 13
<211> 6
5 <212> ADN
   <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético: Secuencia dentro de la región R en la que hibrida la sonda de unión
10

<400> 13
   cagaga                                               6

<210> 14
<211> 27
15 <212> ADN
   <213> Secuencia artificial

<220>
20 <223> Sintético: Secuencia de la sonda de unión

<400> 14
   gctgcatccg gactgtactg ggtctct                       27

25 <210> 15
   <211> 322
   <212> ADN
   <213> Secuencia artificial

30 <220>
   <223> Sintético: Secuencia de U3 de Cal-1

<400> 15

tggaaagggct aattcactcc caacgaagac aagatatcct tgatctgtgg atctaccaca      60
cacaaggcta cttccctgat tggcagaact acacaccagg gccagggatc agatatccac      120
tgacctttgg atggtgctac aagctagtac cagttgagca agagaaggta gaagaagcca      180
atgaaggaga gaacacccgc ttgttacacc ctgtgagcct gcatgggatg gatgaccgg      240
agagagaagt attagagtgg aggtttgaca gccgcctagc atttcatcac atggcccgag      300
35 agctgcatcc ggactgtact gg                                322

<210> 16
<211> 454
40 <212> ADN
   <213> VIH-1

<220>
<221> misc_feature
45 <223> Secuencia U3 de tipo silvestre

<400> 16

```

ES 2 784 351 T3

tggaagggt aattcactcc caacgaagac aagatatacct tgatctgtgg atctaccaca 60
 cacaaggcta cttccctgat tagcagaact acacaccagg gccagggatc agatatccac 120
 tgacctttgg atggtgctac aagctagtagc cagttgagcc agagaagtta gaagaagcca 180
 acaaaggaga gaacaccagc ttgttacacc ctgtgagcct gcatggaatg gatgaccgg 240
 agagagaagt gttagagtgg aggtttgaca gccgcctagc atttcatcac atggcccgg 300
 agctgcatcc ggagtacttc aagaatgctg acatcgagct tgctacaagg gactttccgc 360
 tggggacttt ccagggaggc gtggcctggg cgggactggg gagtggcgag ccctcagatc 420
 ctgcatataa gcagctgctt tttgcctgta ctgg 454

<210> 17

<211> 96

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Sintético: Región R de Cal-1

<400> 17

gtctctctgg ttagaccaga tctgagcctg ggagctctct ggctaactag ggaaccact 60
 gcttaagcct caataaagct tgccttgagt gcttca 96

REIVINDICACIONES

1. Un método de detección de una cantidad de un ácido nucleico lentivírico en una muestra, donde el ácido nucleico lentivírico comprende una delección o mutación dentro de la región U3 de la 3'LTR del ácido nucleico con respecto a la secuencia de tipo silvestre correspondiente, donde la mutación impide que las secuencias LTR impulsen la expresión de un gen cadena abajo, que comprende: (a) poner en contacto la muestra con un primer cebador directo y un primer cebador inverso; (b) poner en contacto la muestra con una sonda de unión específica para un sitio de unión dentro de la 3' LTR del ácido nucleico lentivírico, donde la sonda de unión comprende una primera porción que es capaz de hibridar con al menos una porción de una secuencia dentro de la región U3 de la 3'LTR del ácido nucleico lentivírico y una segunda porción que es capaz de hibridar con al menos una porción de una secuencia dentro de la región R de la 3'LTR del ácido nucleico lentivírico, donde la sonda de unión no es capaz de hibridar con la secuencia de tipo silvestre correspondiente, y donde la sonda de unión comprende una primera fracción detectable; y (c) detectar señales procedentes de la primera fracción detectable.
2. El método de la reivindicación 1, donde la primera porción de la sonda de unión hibrida con una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 80 % de identidad con la de la SEQ ID NO: 12.
3. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la segunda porción de la sonda de unión hibrida con una secuencia de nucleótidos que tiene la SEQ ID NO: 13.
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la sonda de unión comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 90 % de identidad con la de la SEQ ID NO: 14.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende adicionalmente detectar una cantidad de un ácido nucleico de VIH en la muestra, donde la detección de la cantidad del ácido nucleico lentivírico y la cantidad de ácido nucleico de VIH en la muestra tiene lugar en el mismo tubo de reacción, donde la 3' LTR del ácido nucleico lentivírico no comprende una secuencia de caja TATA, y donde la detección de la cantidad del ácido nucleico de VIH comprende poner en contacto la muestra con una segunda sonda específica para una secuencia de la caja TATA dentro de una 3'LTR de una secuencia de ácido nucleico de VIH, estando la segunda sonda conjugada con una segunda fracción detectable; y detectar señales procedentes de la segunda fracción detectable.
6. El método de la reivindicación 5, donde la segunda sonda tiene una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 90 % de identidad con la de la SEQ ID NO: 10.
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 6, donde el primer cebador directo es un cebador NuAf y el primer cebador inverso es un cebador LTR-rev.
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende adicionalmente detectar una cantidad de un ácido nucleico de VIH en la muestra, donde la detección de la cantidad del ácido nucleico lentivírico y la cantidad de ácido nucleico de VIH en la muestra tiene lugar en distintos tubos de reacción, y donde la detección de la cantidad del ácido nucleico de VIH comprende poner en contacto la muestra con un segundo cebador directo, un segundo cebador inverso y una segunda sonda que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 90 % de identidad con la de la SEQ ID NO: 8, donde la segunda sonda comprende una segunda fracción detectable; y detectar señales procedentes de la segunda fracción detectable.
9. El método de la reivindicación 8, donde el segundo cebador directo comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 80 % de identidad con la de la SEQ ID NO: 4, y donde el segundo cebador inverso comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 6.
10. Un método de cuantificación de una cantidad de un ácido nucleico lentivírico y una cantidad de un ácido nucleico de VIH en una muestra, comprendiendo el ácido nucleico lentivírico y el ácido nucleico de VIH distintas 3'LTR, comprendiendo el método amplificar tanto el ácido nucleico lentivírico como el ácido nucleico de VIH con un cebador directo que hibrida con una secuencia dentro tanto de la 3'LTR del ácido nucleico lentivírico como de la 3'LTR del ácido nucleico de VIH, y un cebador inverso que hibrida con una secuencia dentro tanto de la 3'LTR del ácido nucleico lentivírico como de la 3'LTR del ácido nucleico de VIH, y donde la amplificación tanto del ácido nucleico lentivírico como del ácido nucleico de VIH tiene lugar en un único tubo de reacción; donde el cebador directo tiene una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 90 % de identidad con la de la SEQ ID NO: 2; y donde el cebador inverso tiene una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 6.
11. El método de la reivindicación 10, donde la 3'LTR del ácido nucleico lentivírico comprende al menos 50 nucleótidos menos que la 3'LTR del ácido nucleico de VIH.
12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 10 a 11, donde la amplificación produce un amplicón de ácido nucleico lentivírico que tiene un primer tamaño y un amplicón de ácido nucleico de VIH que tiene un segundo tamaño, donde el amplicón del ácido nucleico lentivírico es más pequeño que el amplicón del ácido nucleico de VIH.

13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, donde se utiliza una separación electroforética para separar el amplicón de ácido nucleico lentivírico y el amplicón de ácido nucleico de VIH.

5 14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, donde la 3'LTR del ácido nucleico lentivírico comprende una región U3 que tiene una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 15.

15. El método de cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, donde la 3'LTR del ácido nucleico de VIH comprende una región U3 que tiene una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 16.

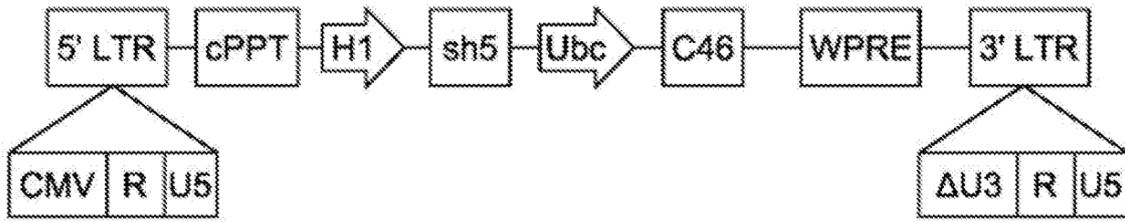


FIG. 1A

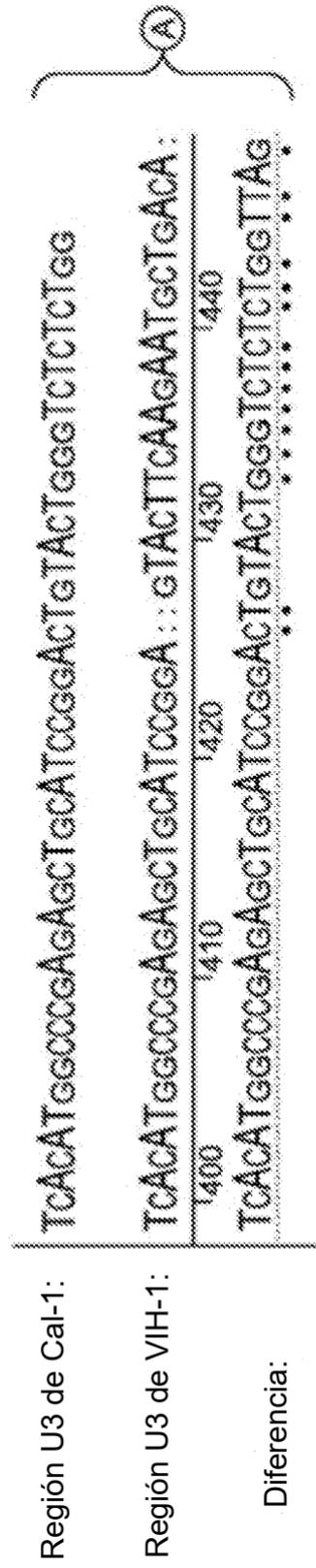


FIG. 1B

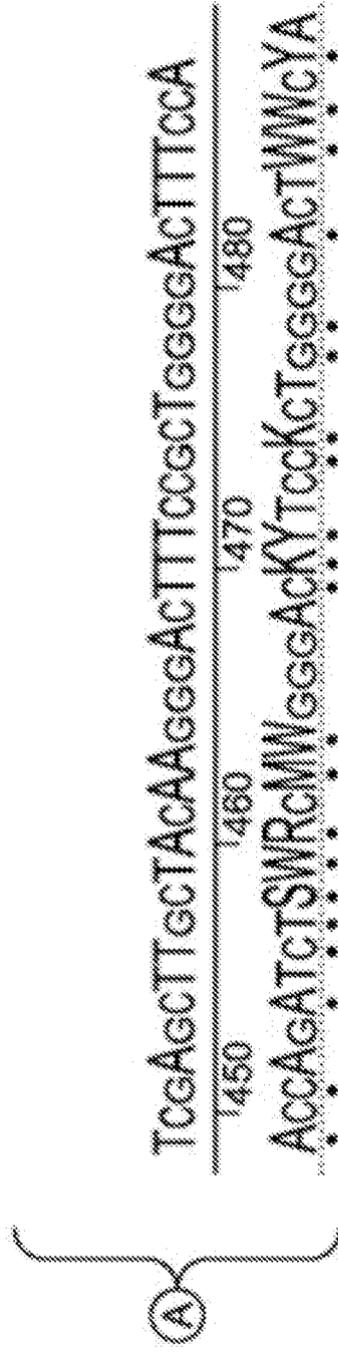


FIG. 1C



FIG. 1D

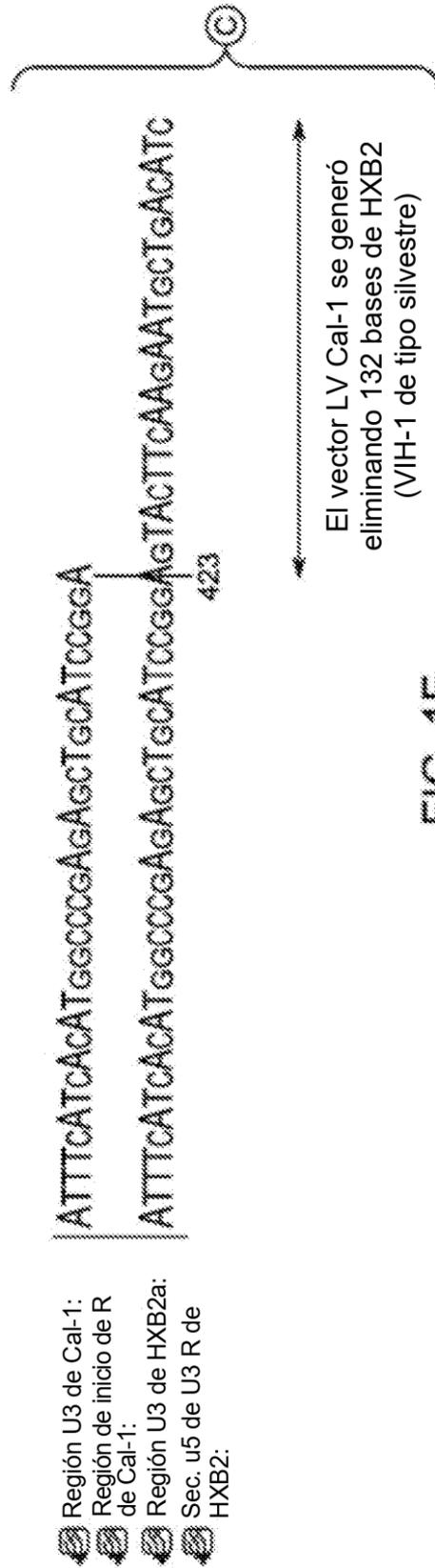


FIG. 1F

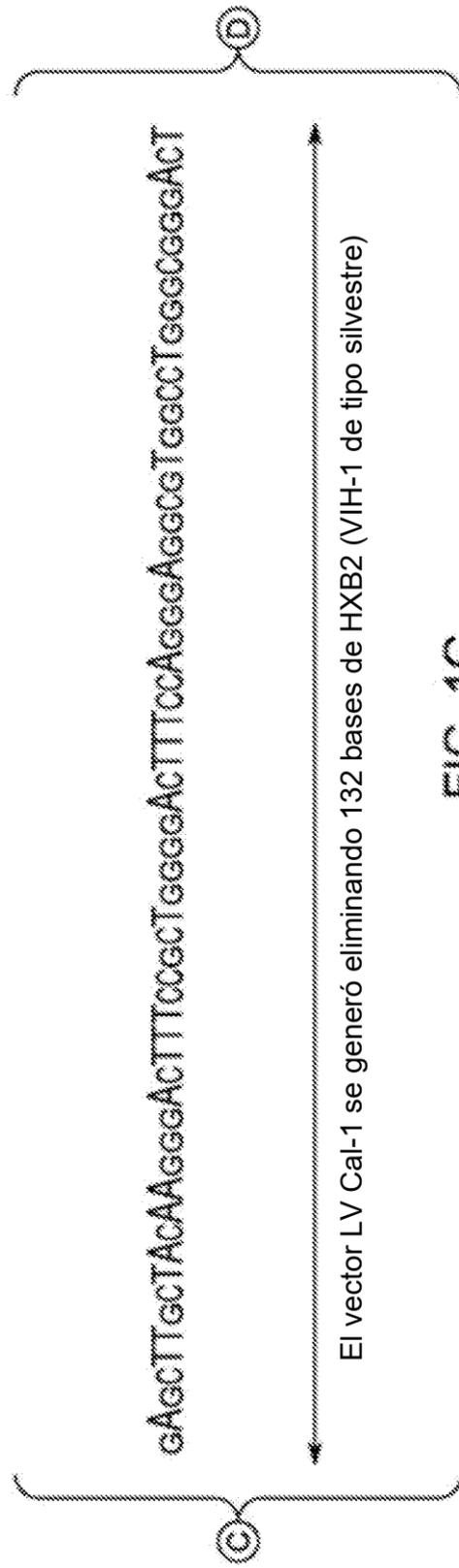


FIG. 1G

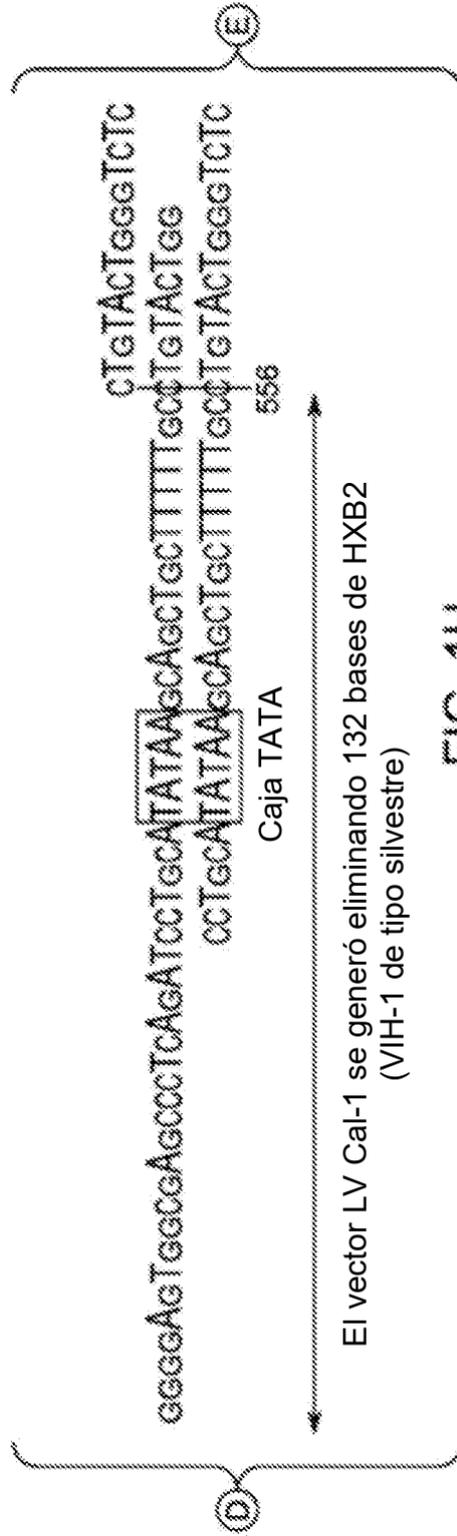


FIG. 1H

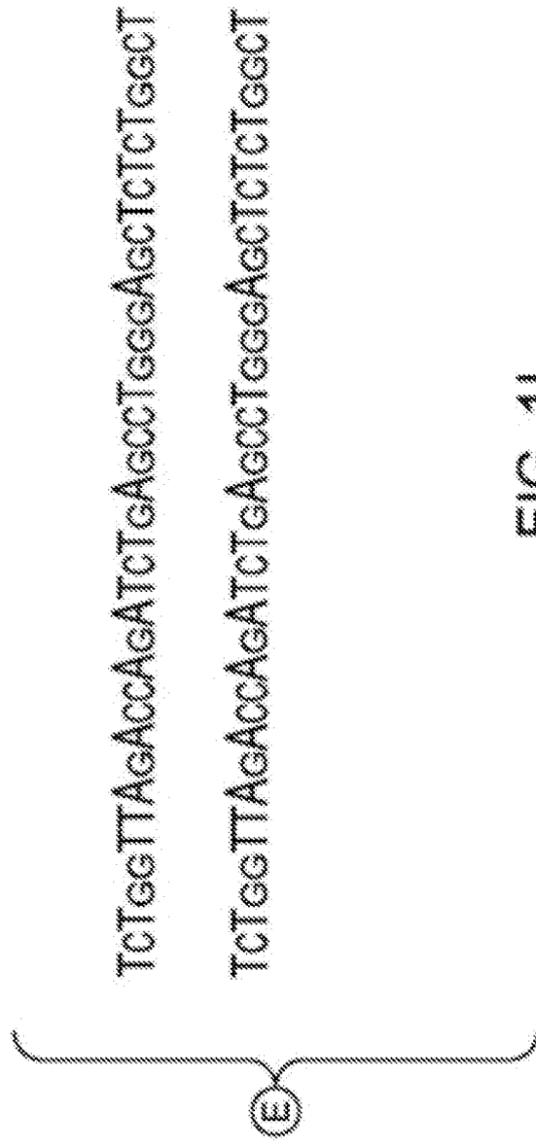


FIG. 11

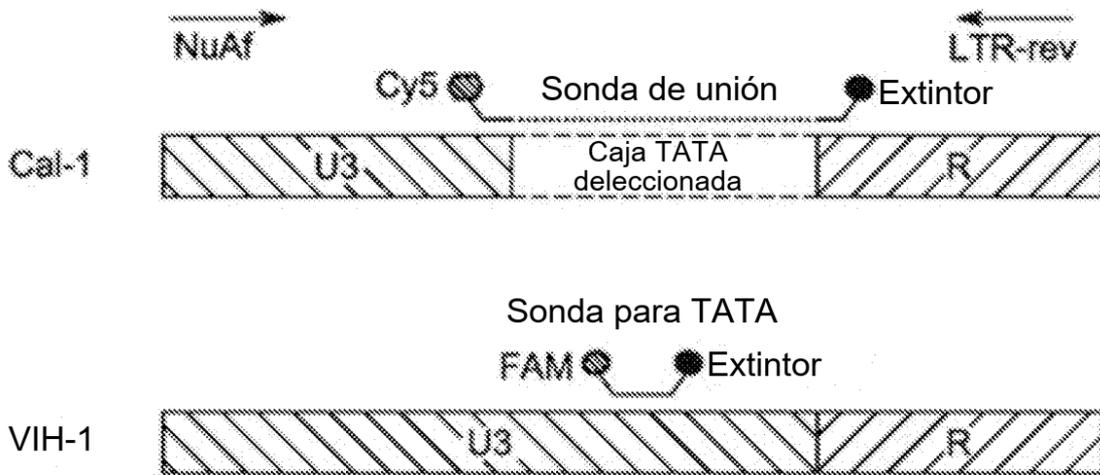


FIG. 2

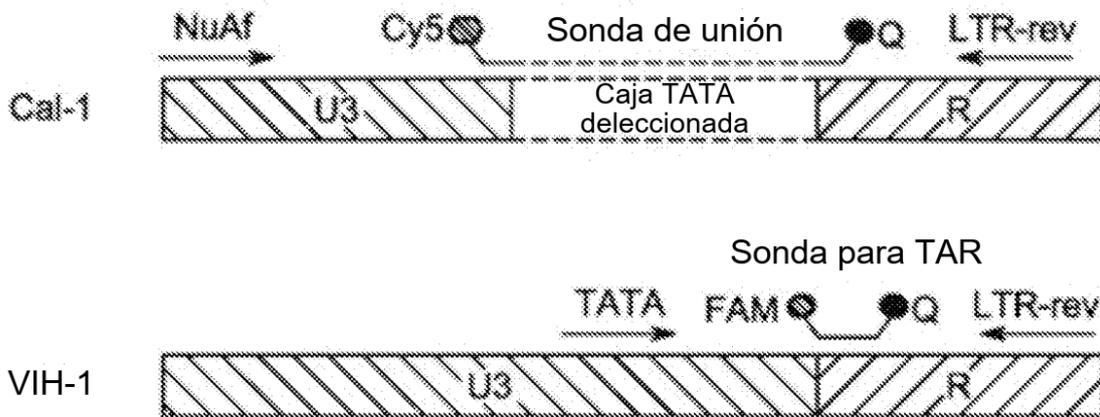


FIG. 3

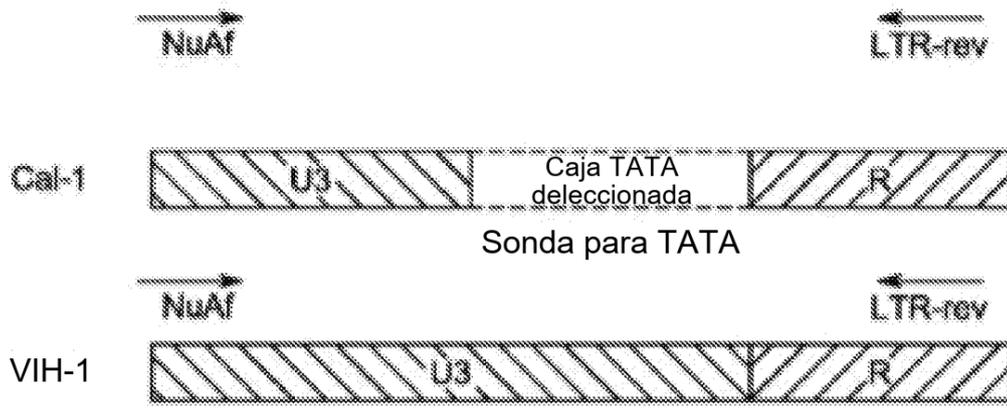


FIG. 4

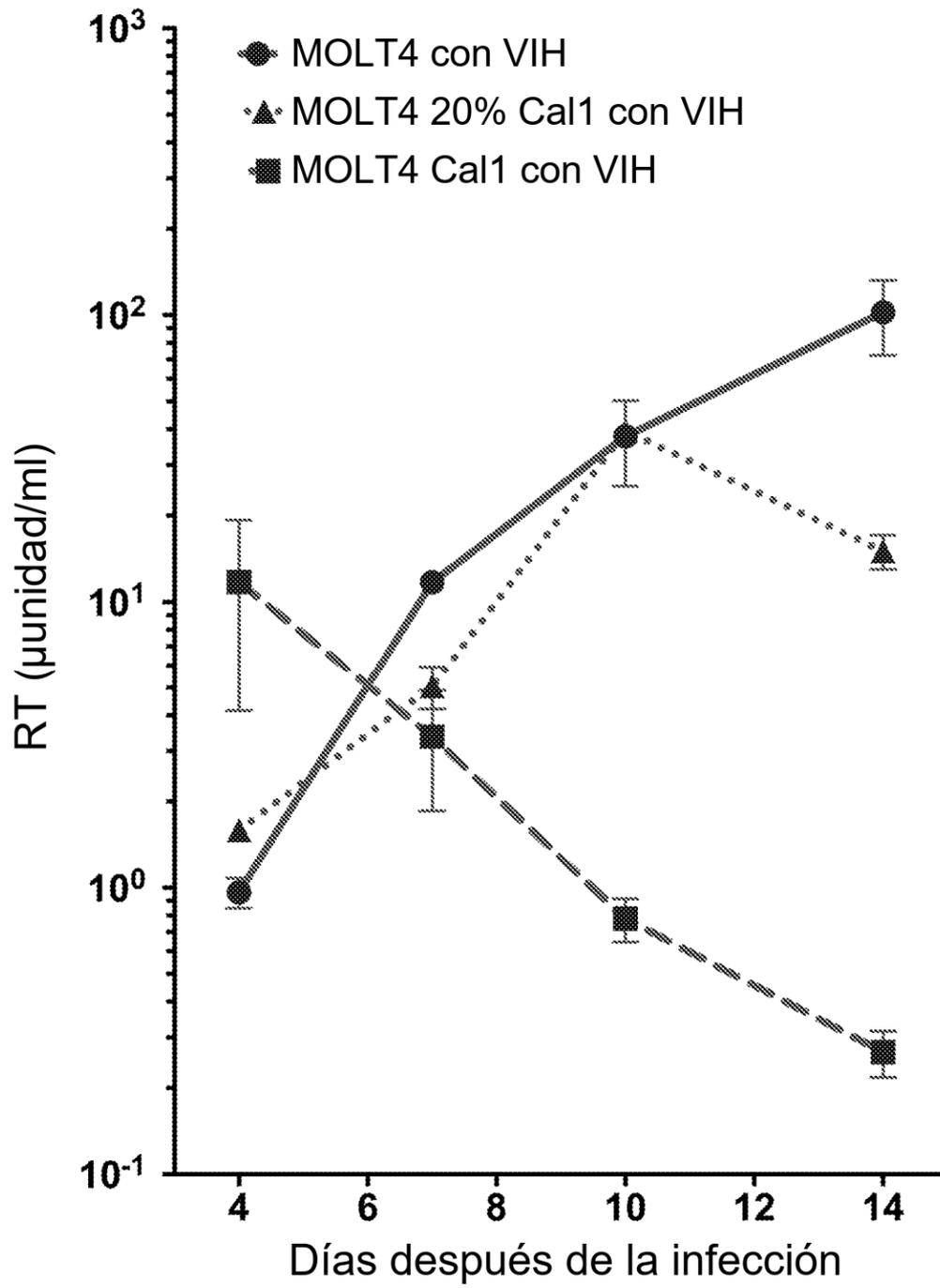


FIG. 5A

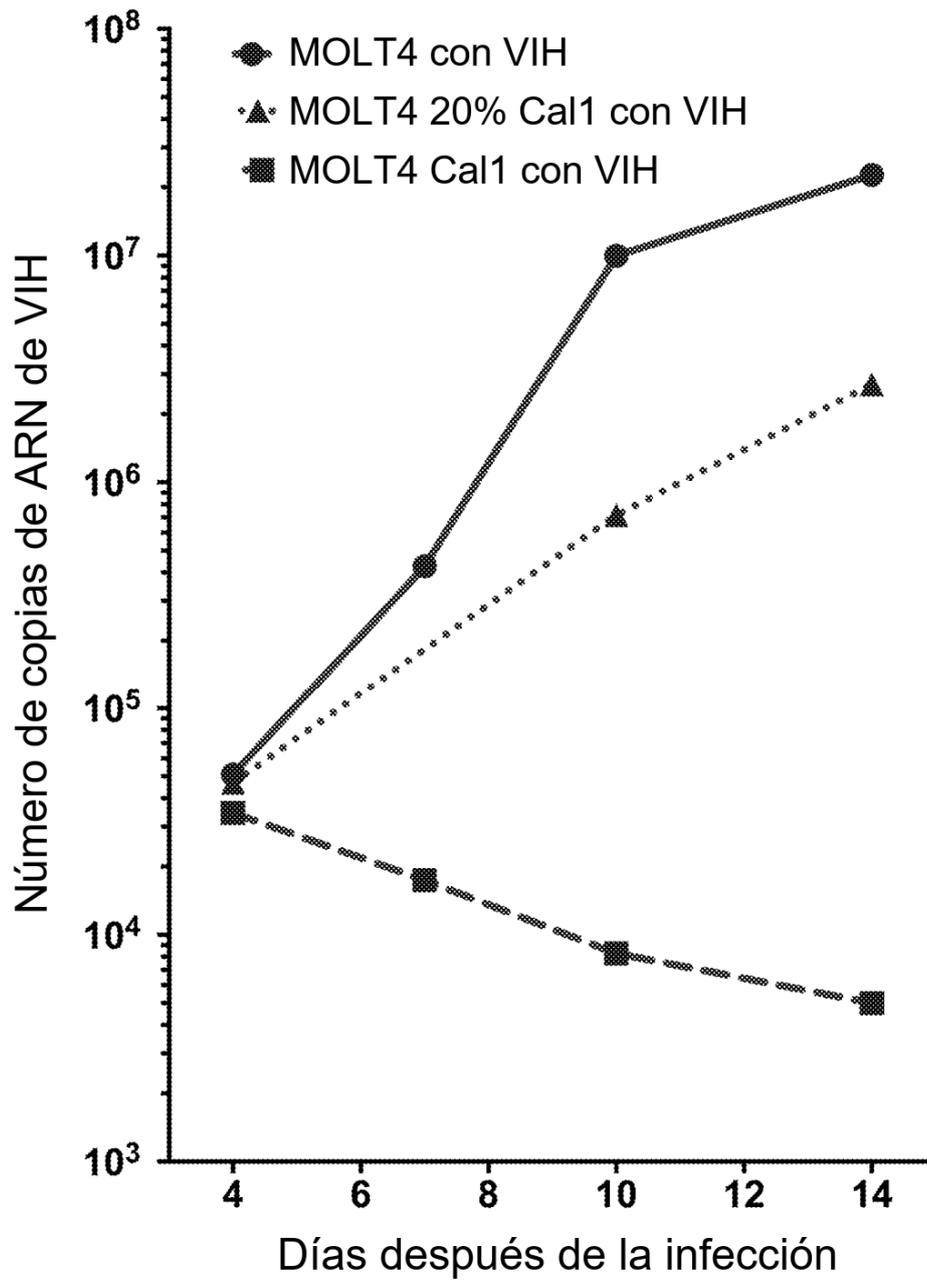


FIG. 5B

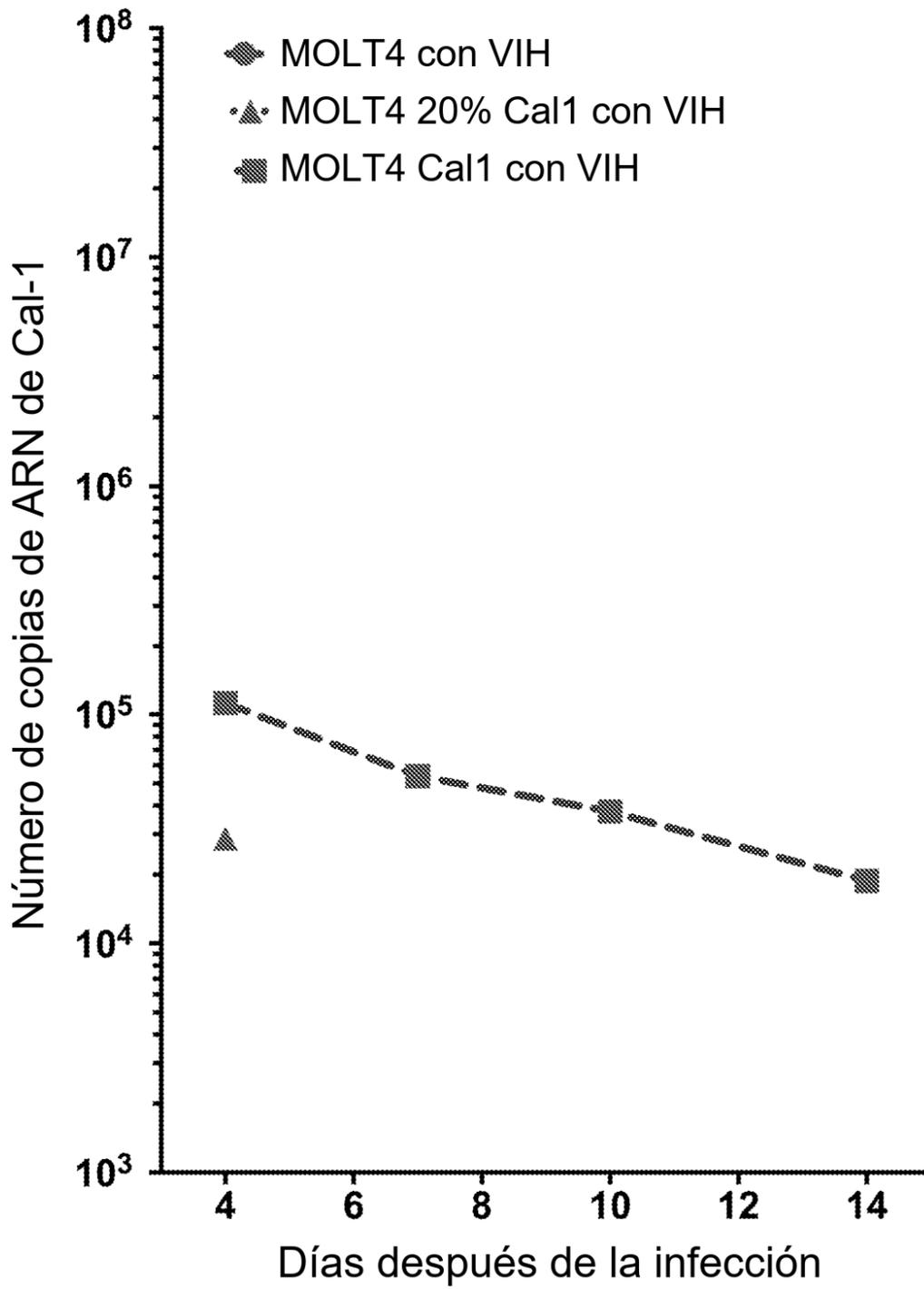


FIG. 5C

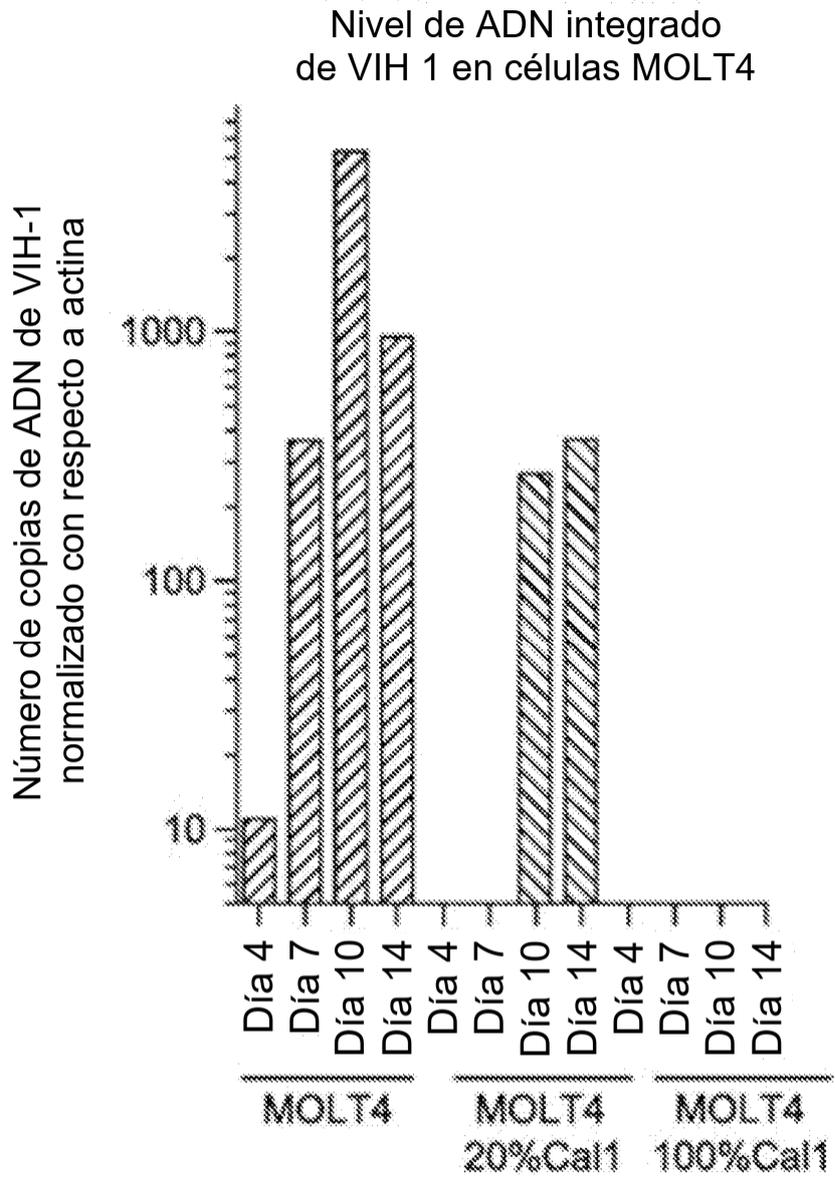


FIG. 6A

Nivel de ADN integrado
de Cal 1 en células MOLT4

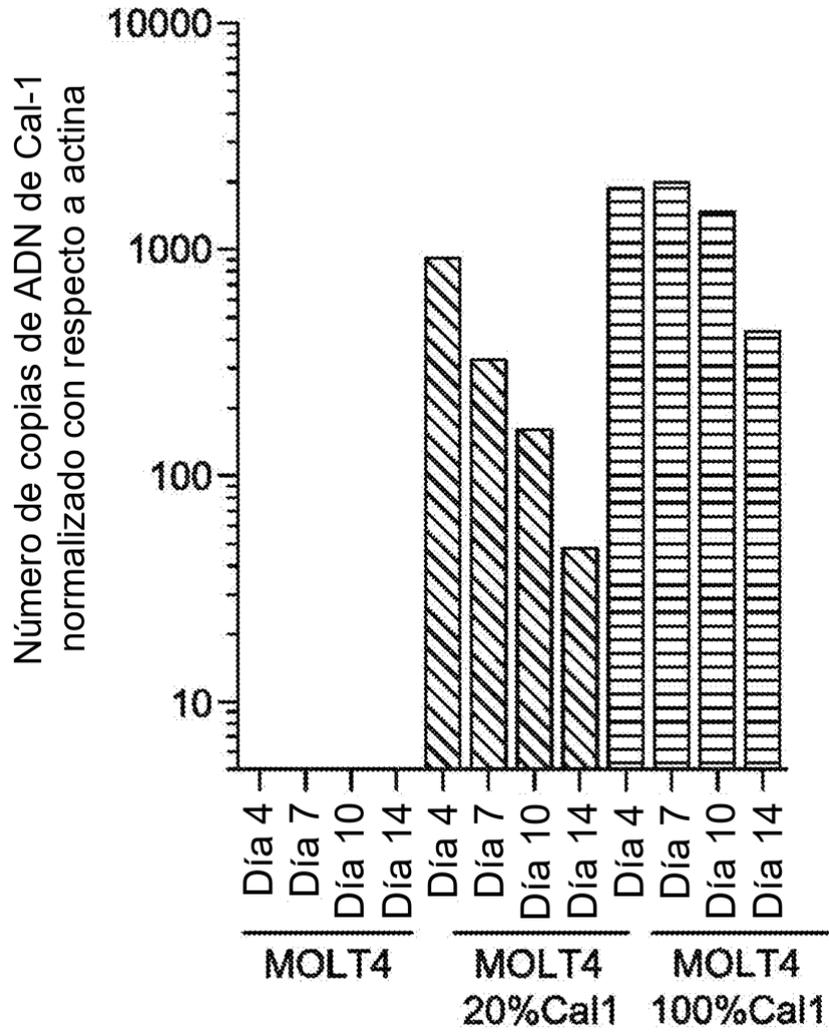


FIG. 6B

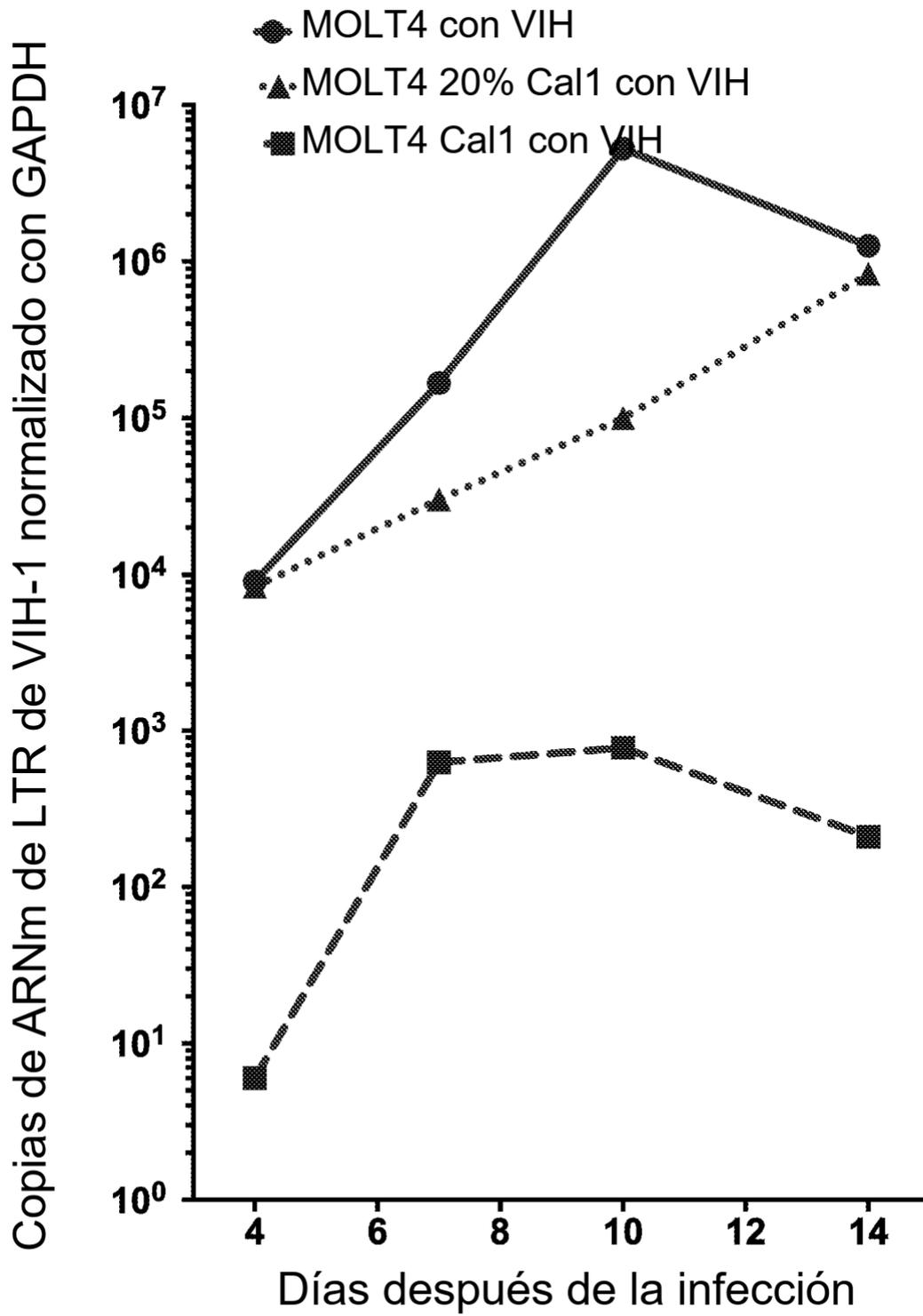


FIG. 6C

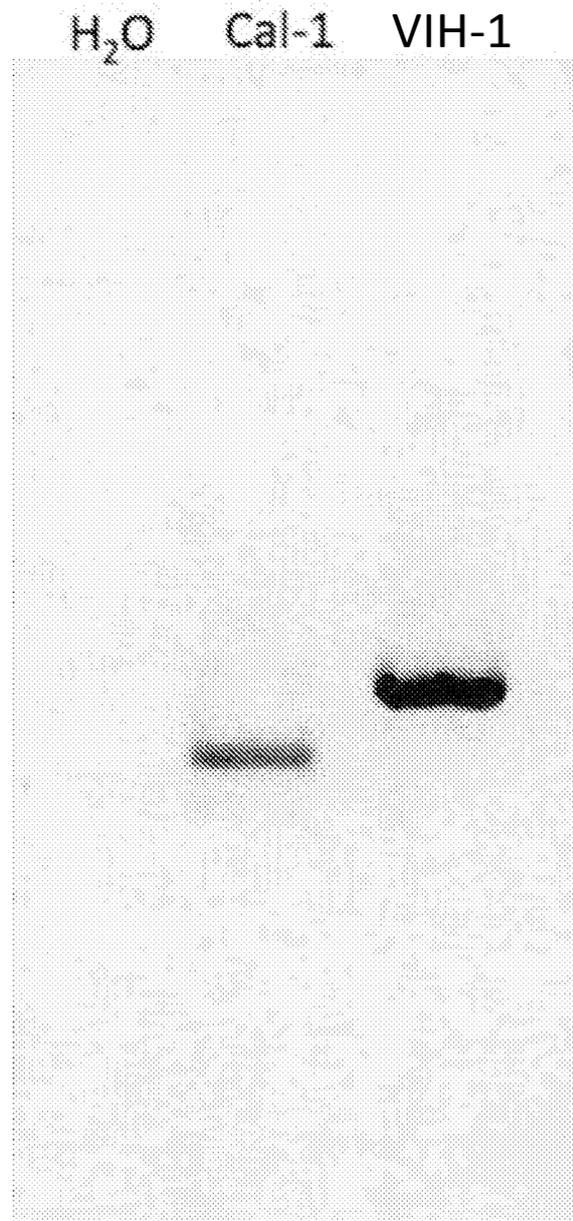


FIG. 7

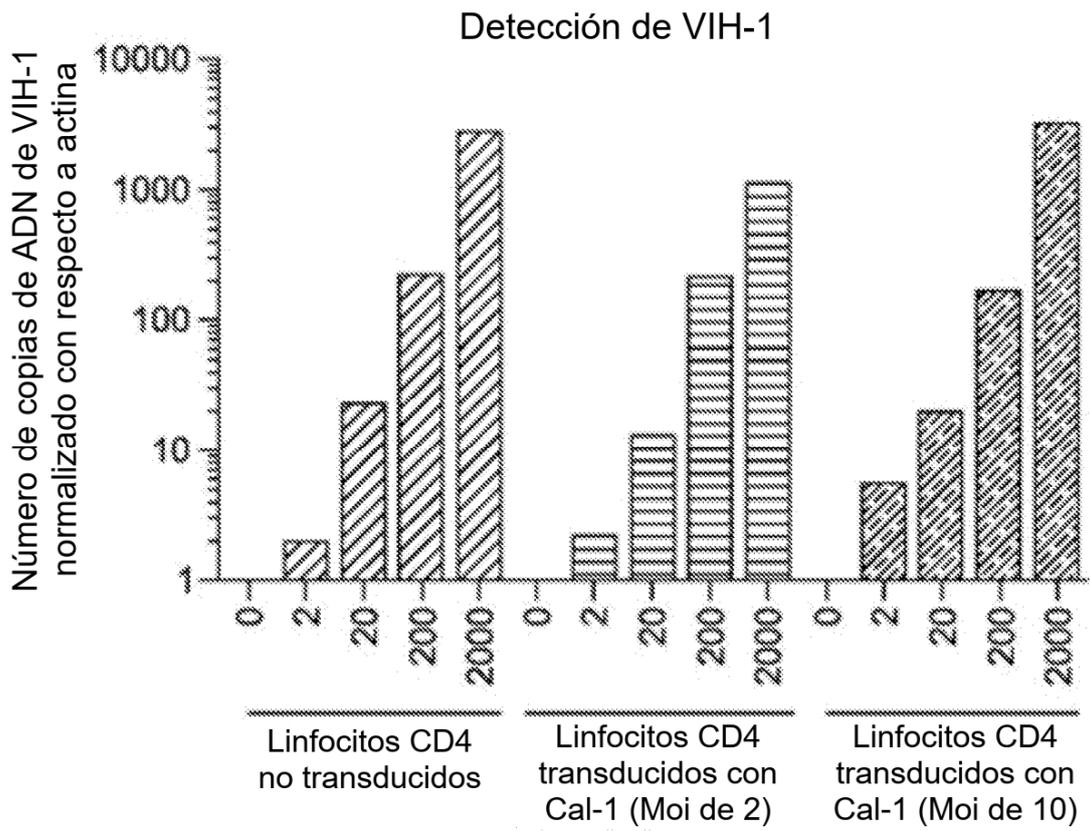


FIG. 8A

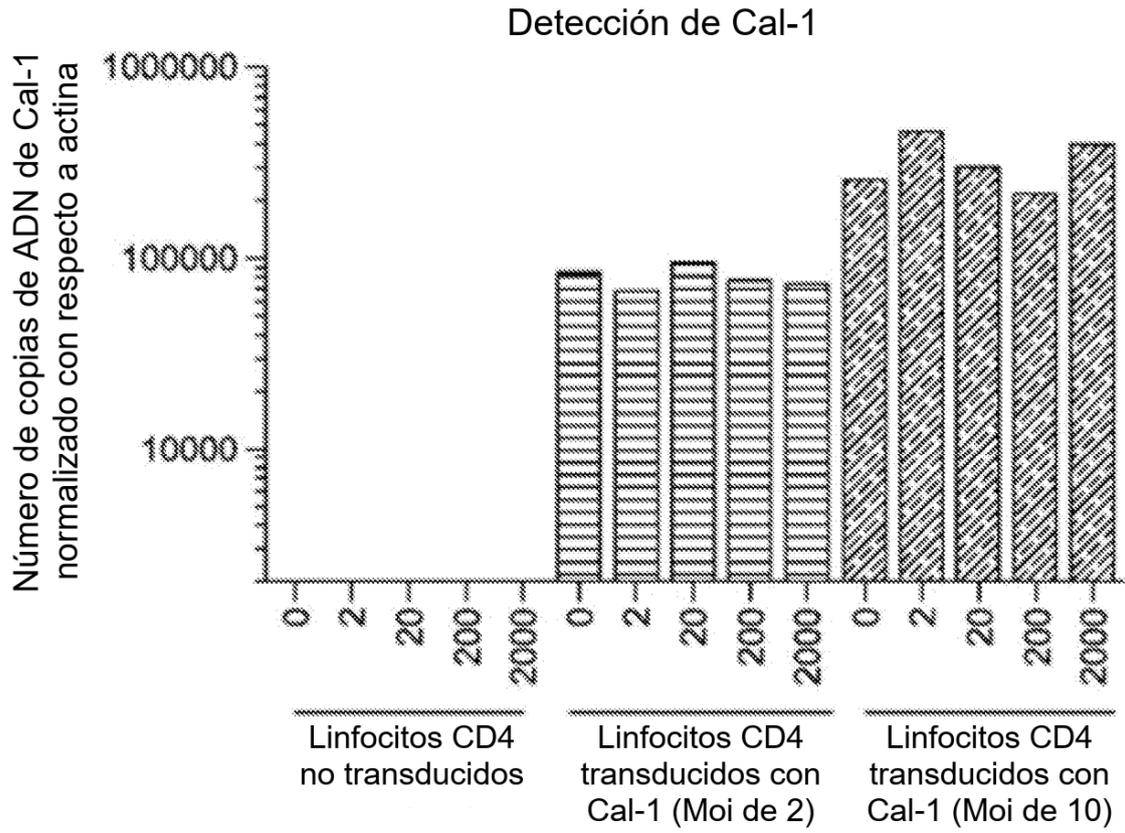


FIG. 8B

Análisis de VIH-1 y Cal-1 en ADN extraído de pacientes positivos para VIH-1

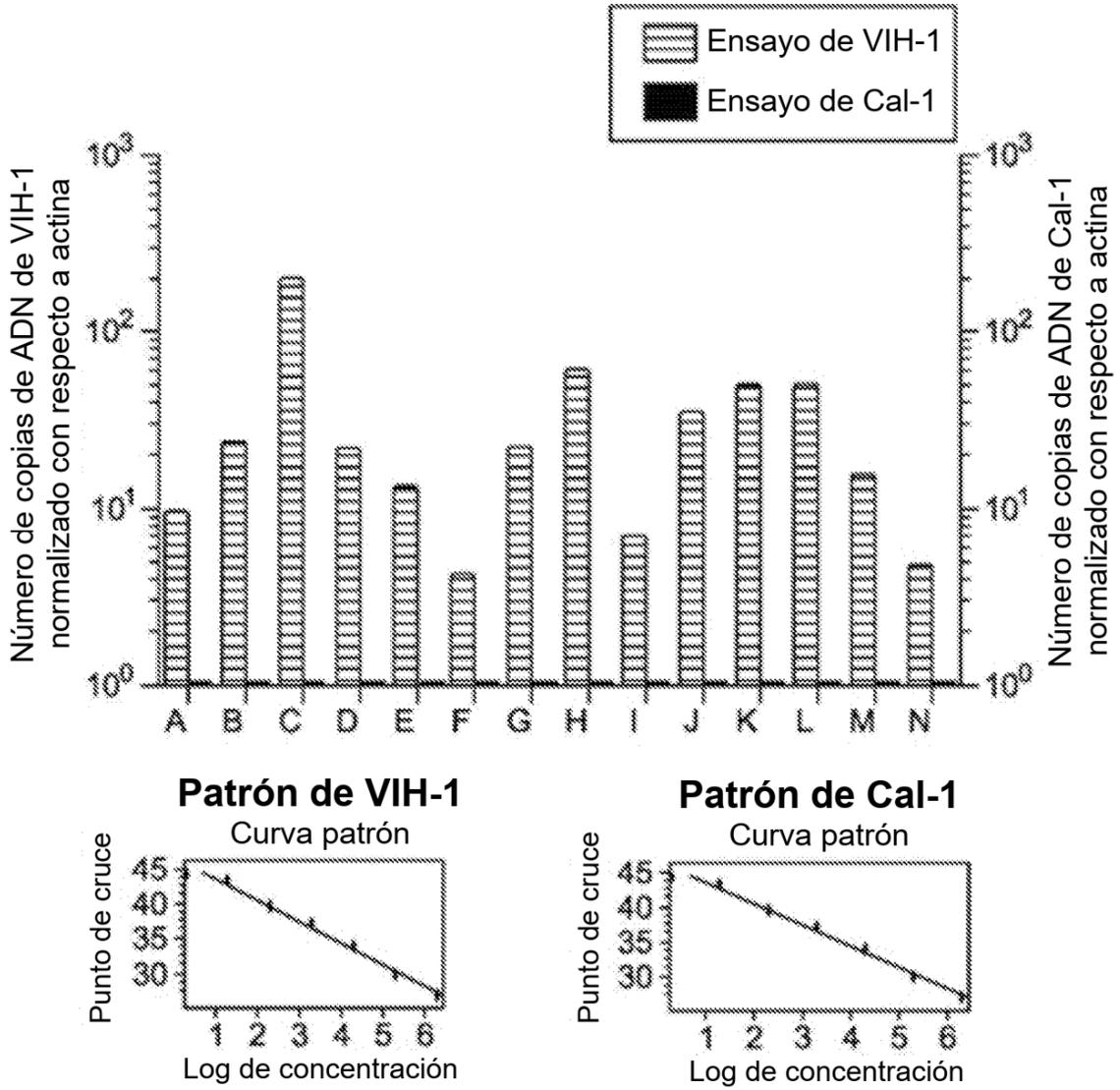


FIG. 9

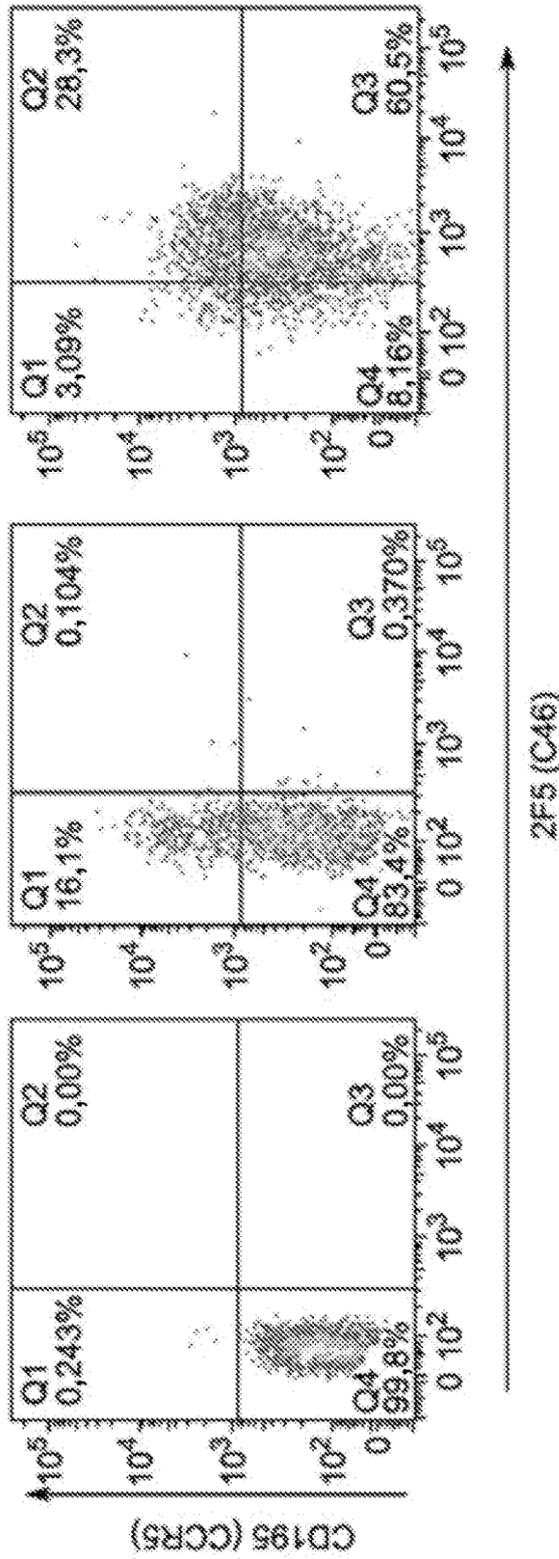
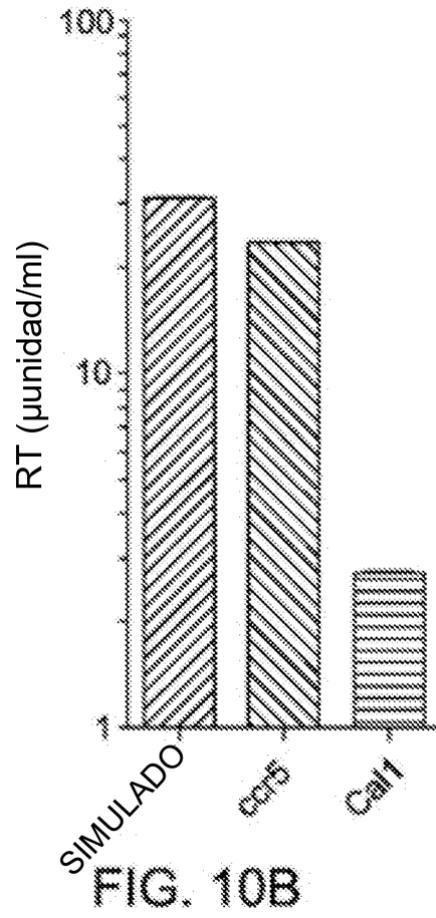


FIG. 10A



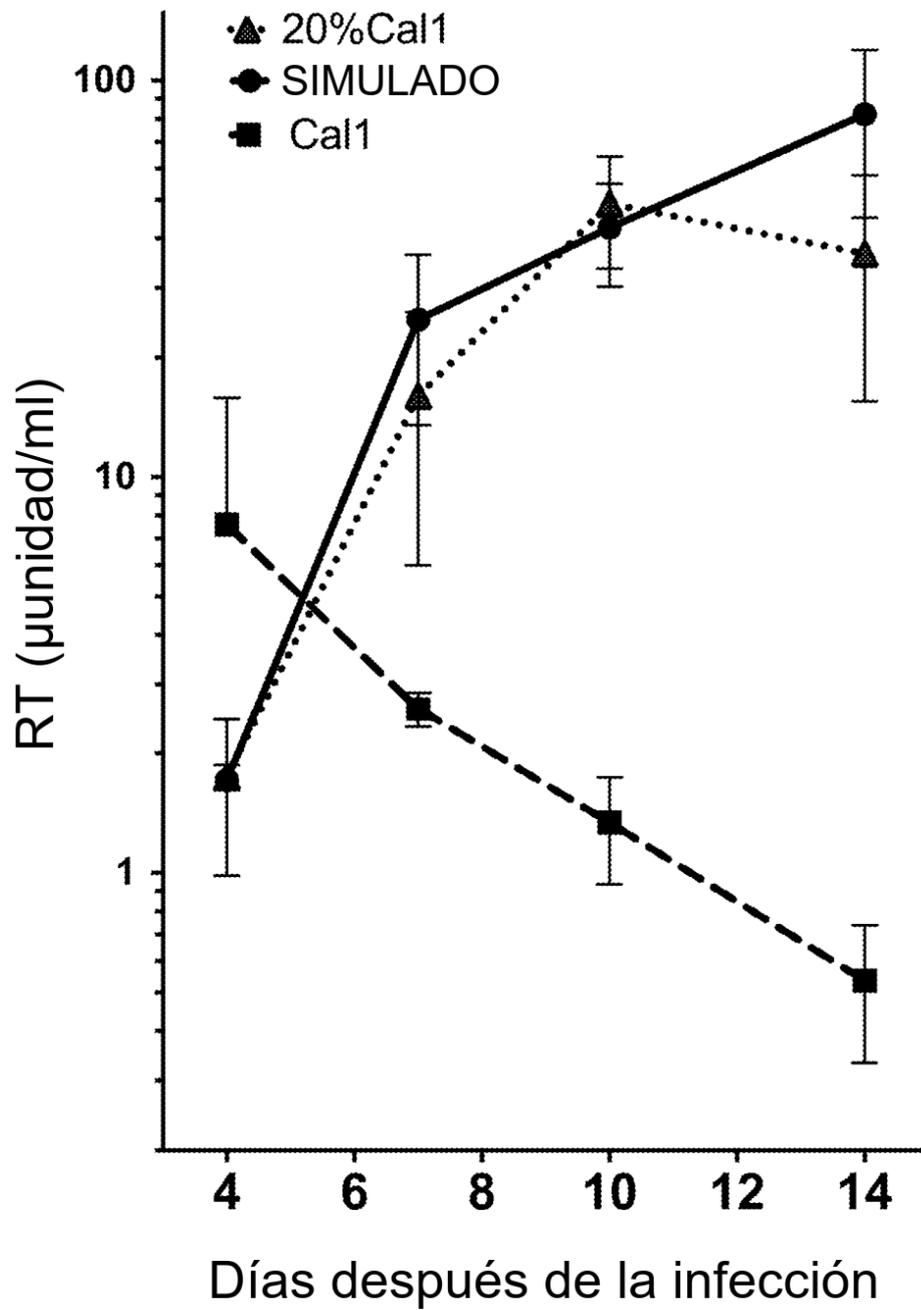


FIG. 10C

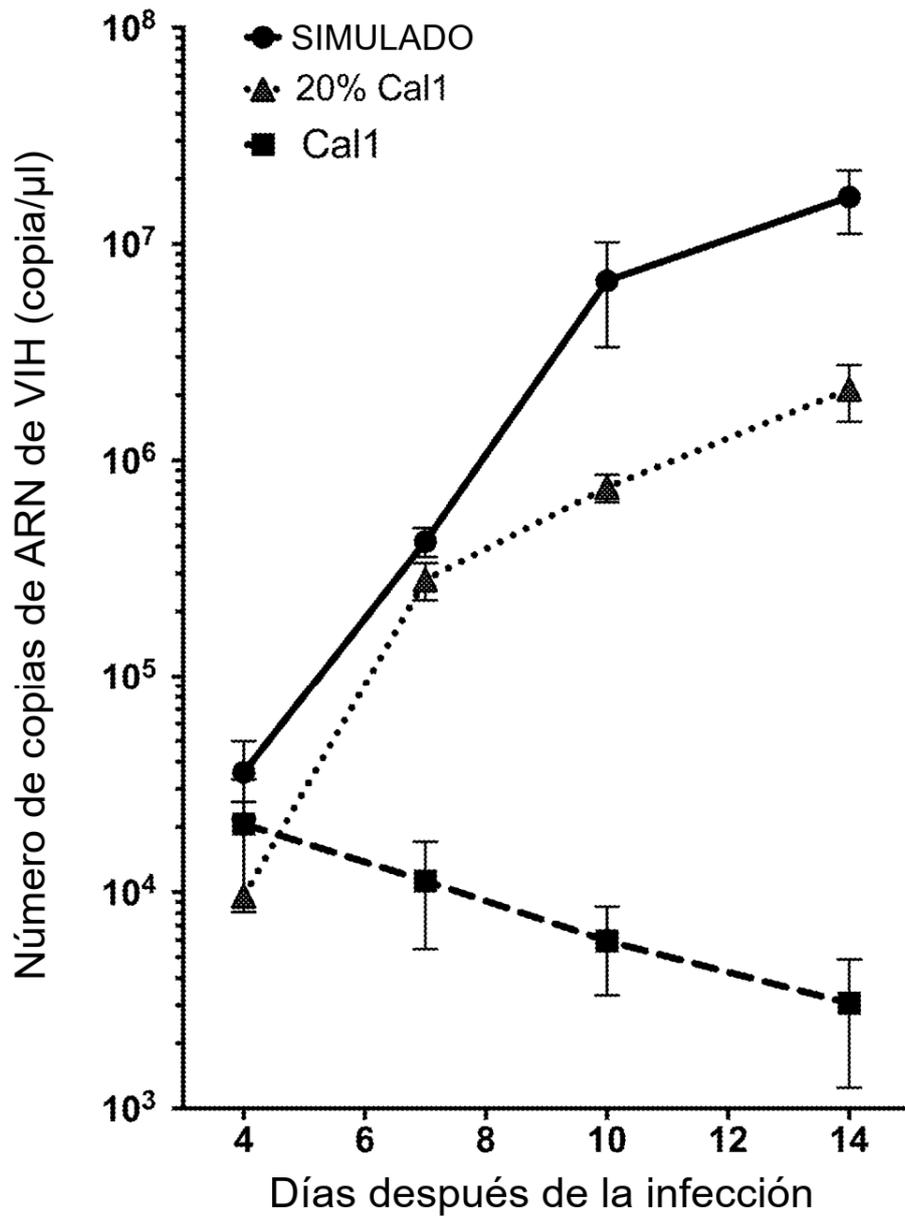


FIG. 10D

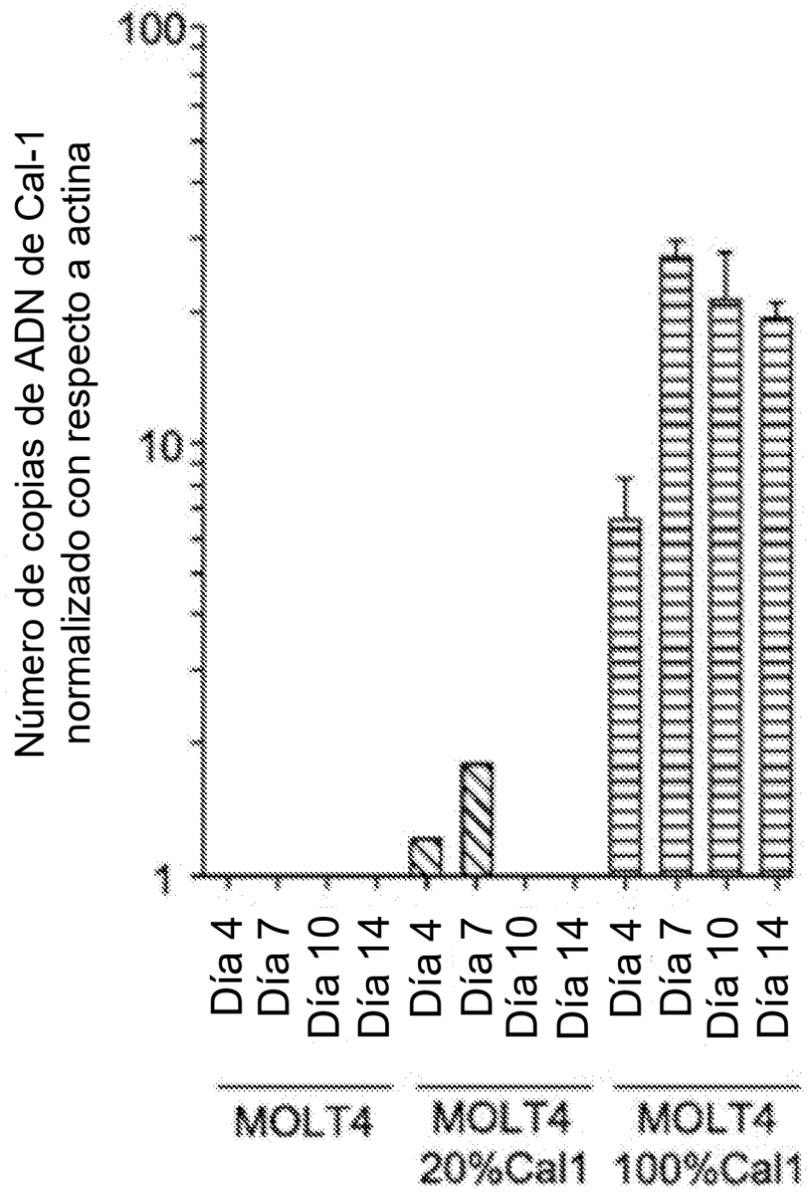


FIG. 11A

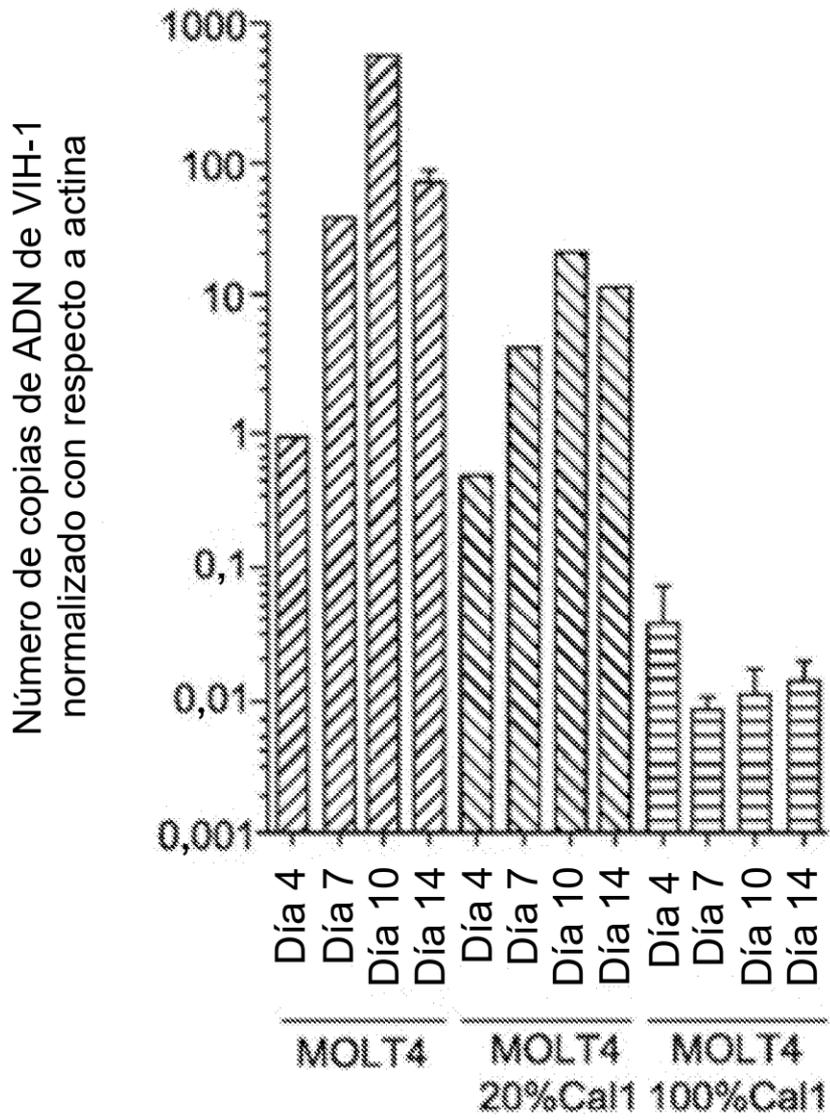


FIG. 11B

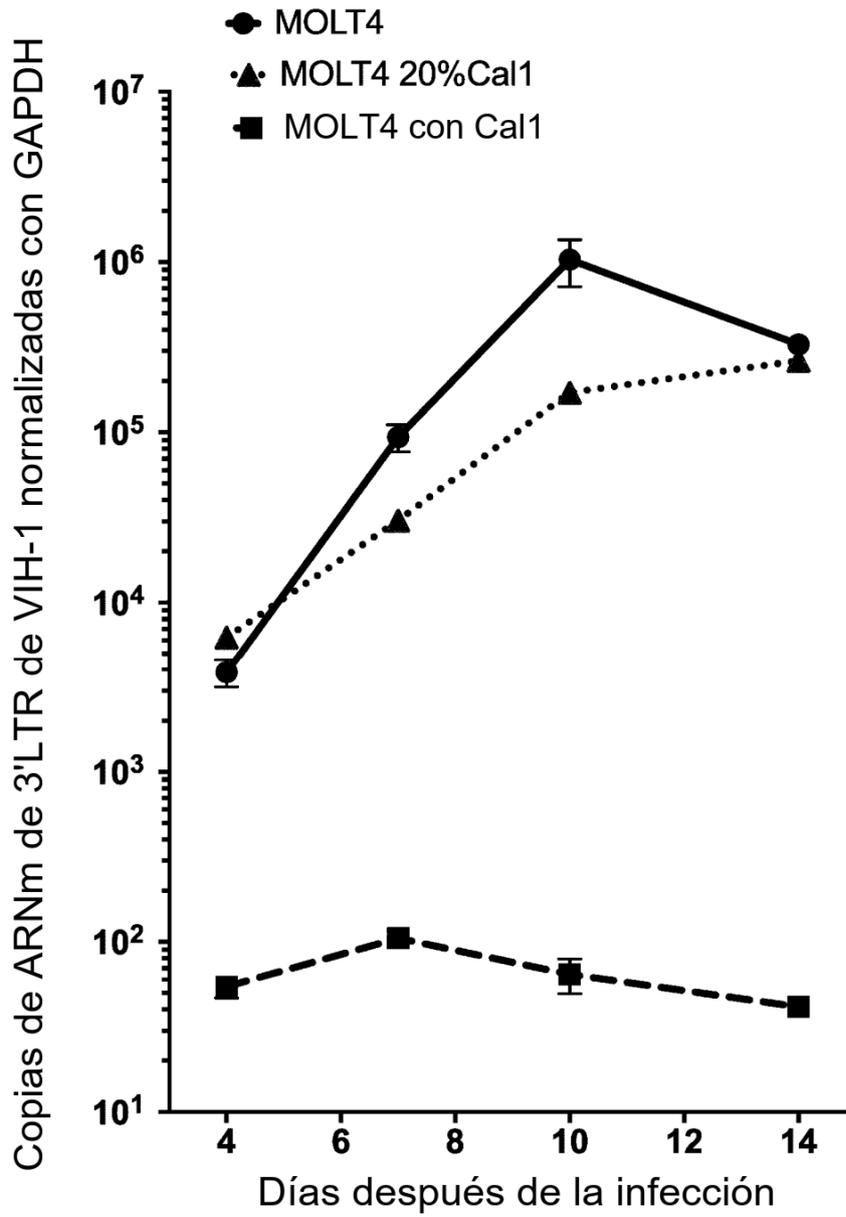


FIG. 12A

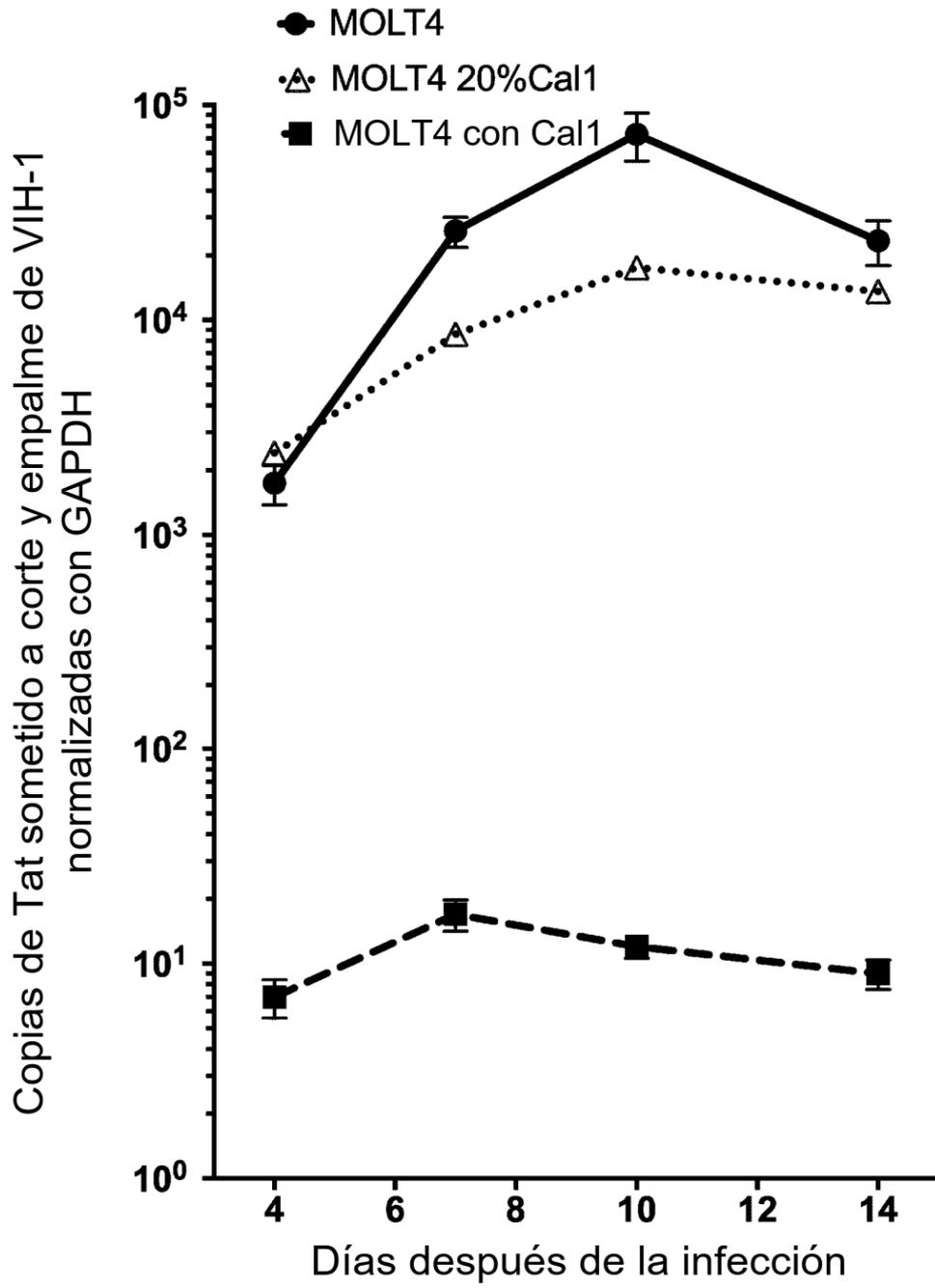


FIG. 12B

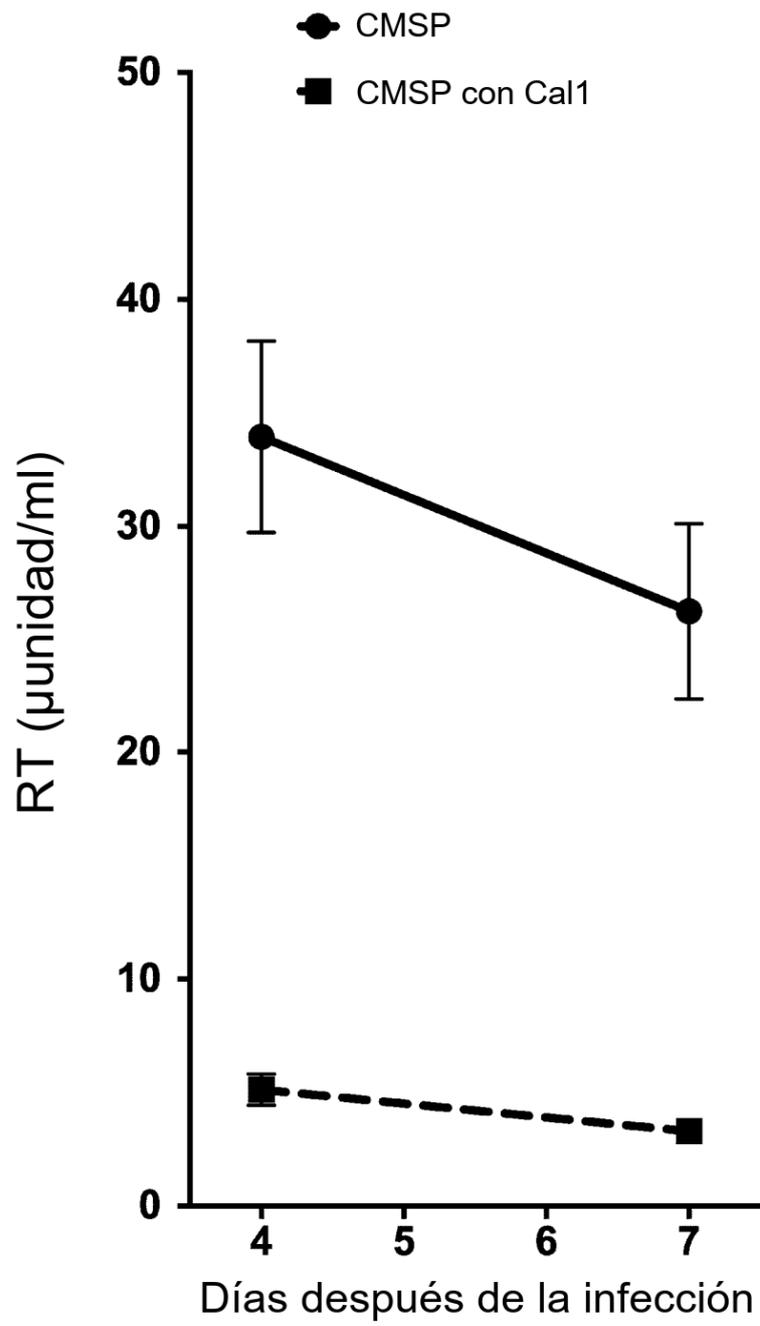


FIG. 13A

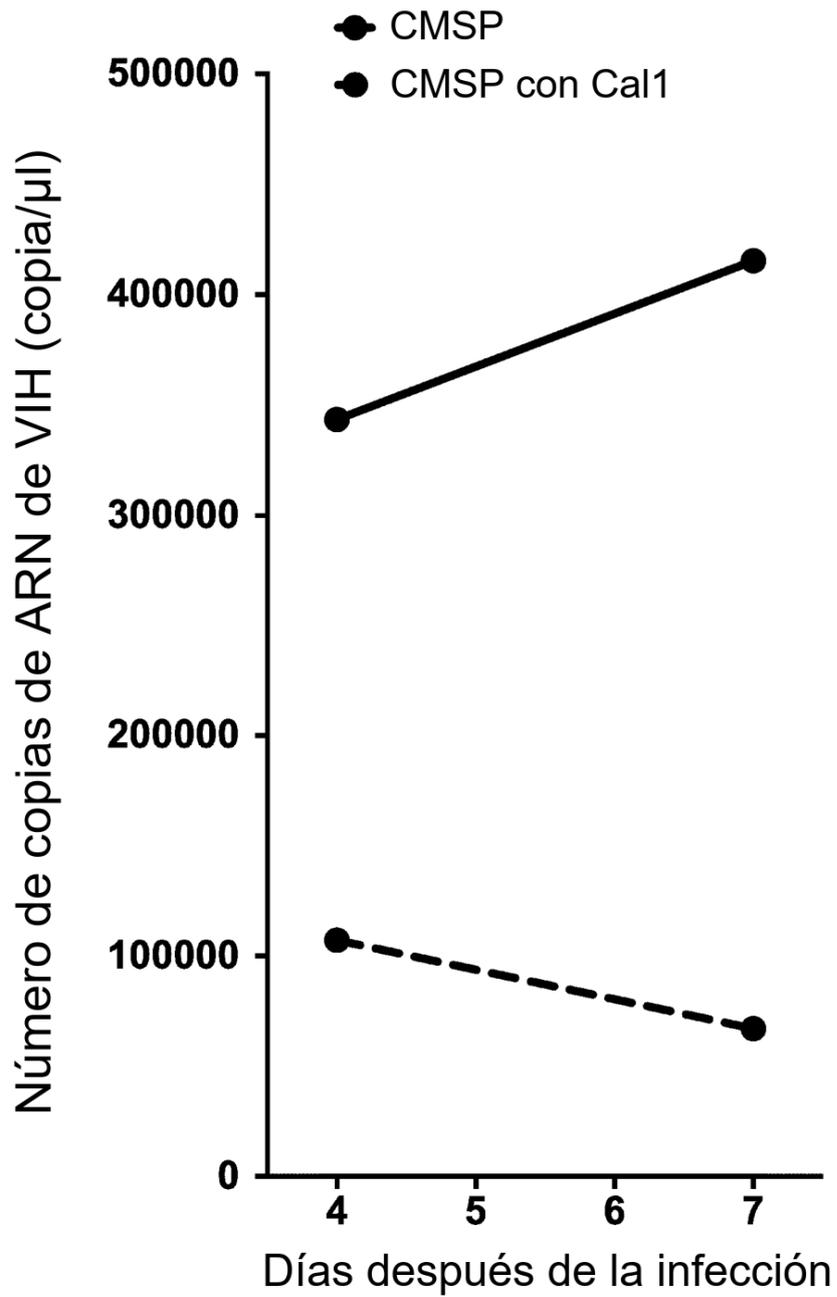
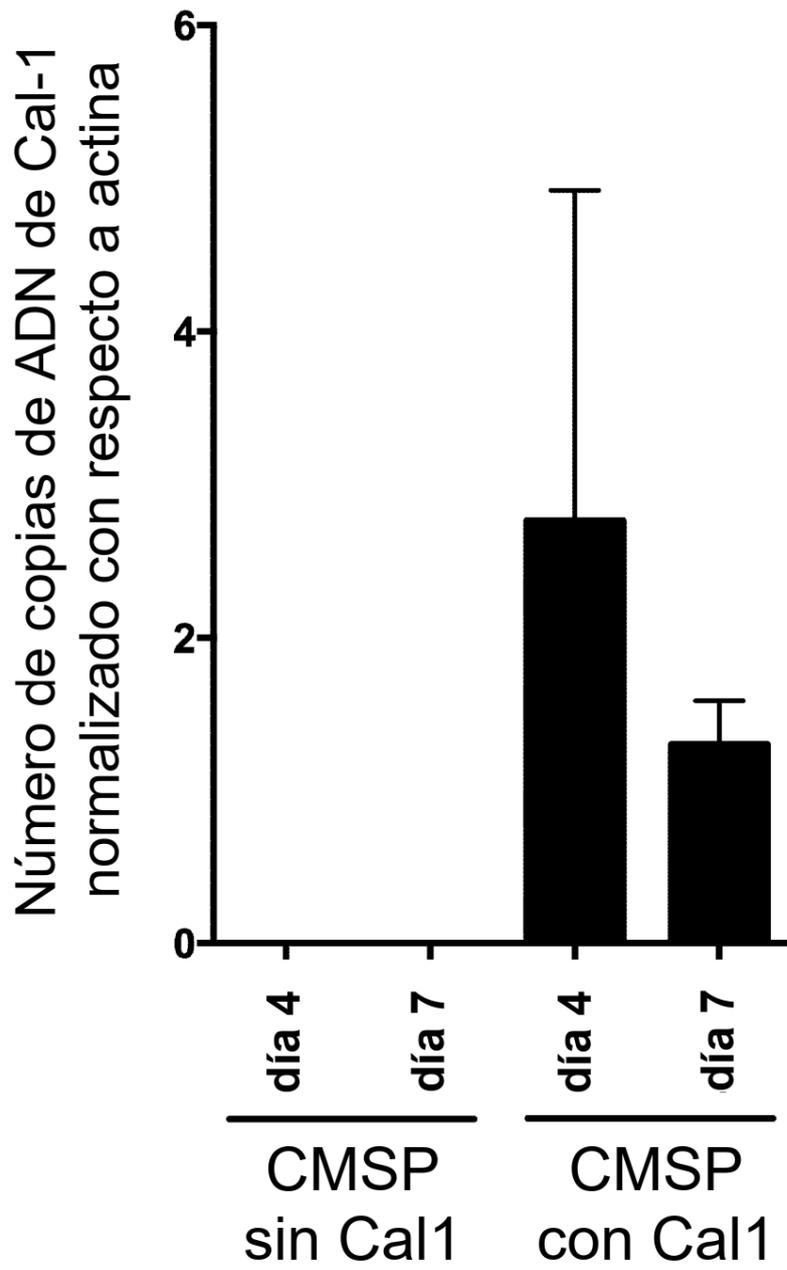


FIG. 13B

**FIG. 14A**

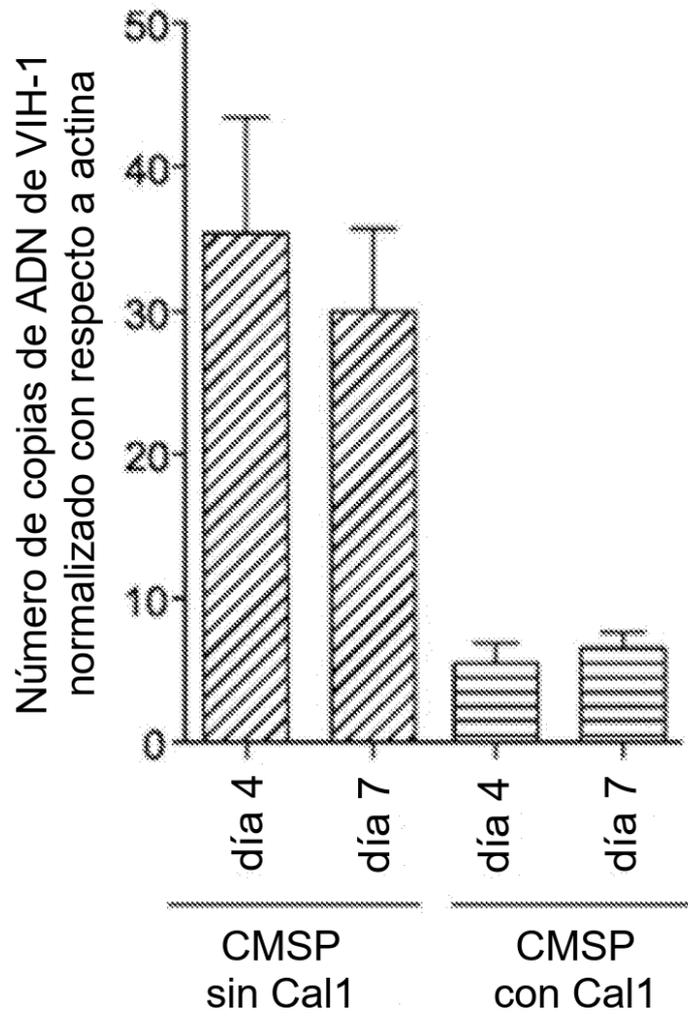


FIG. 14B

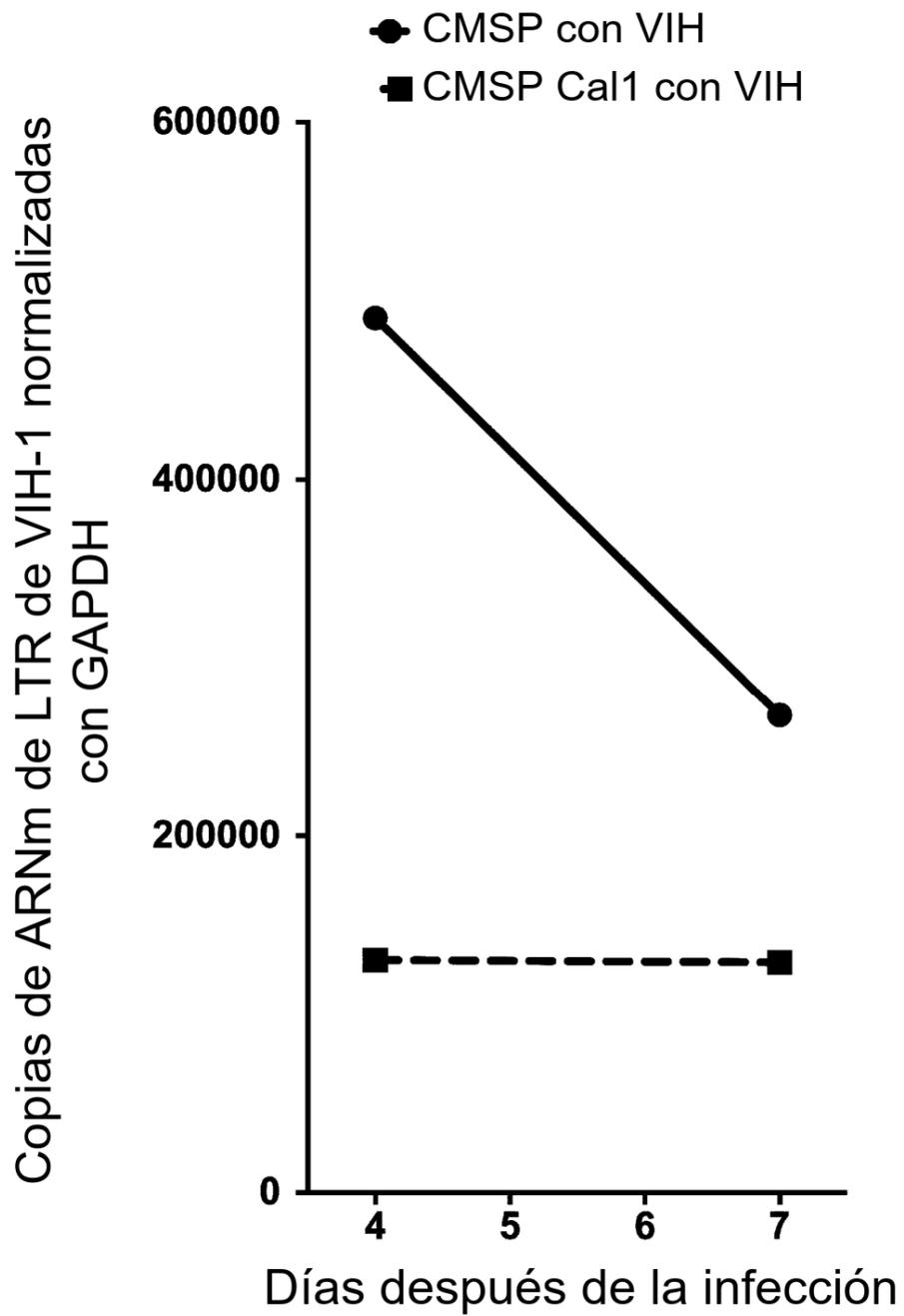


FIG. 14C

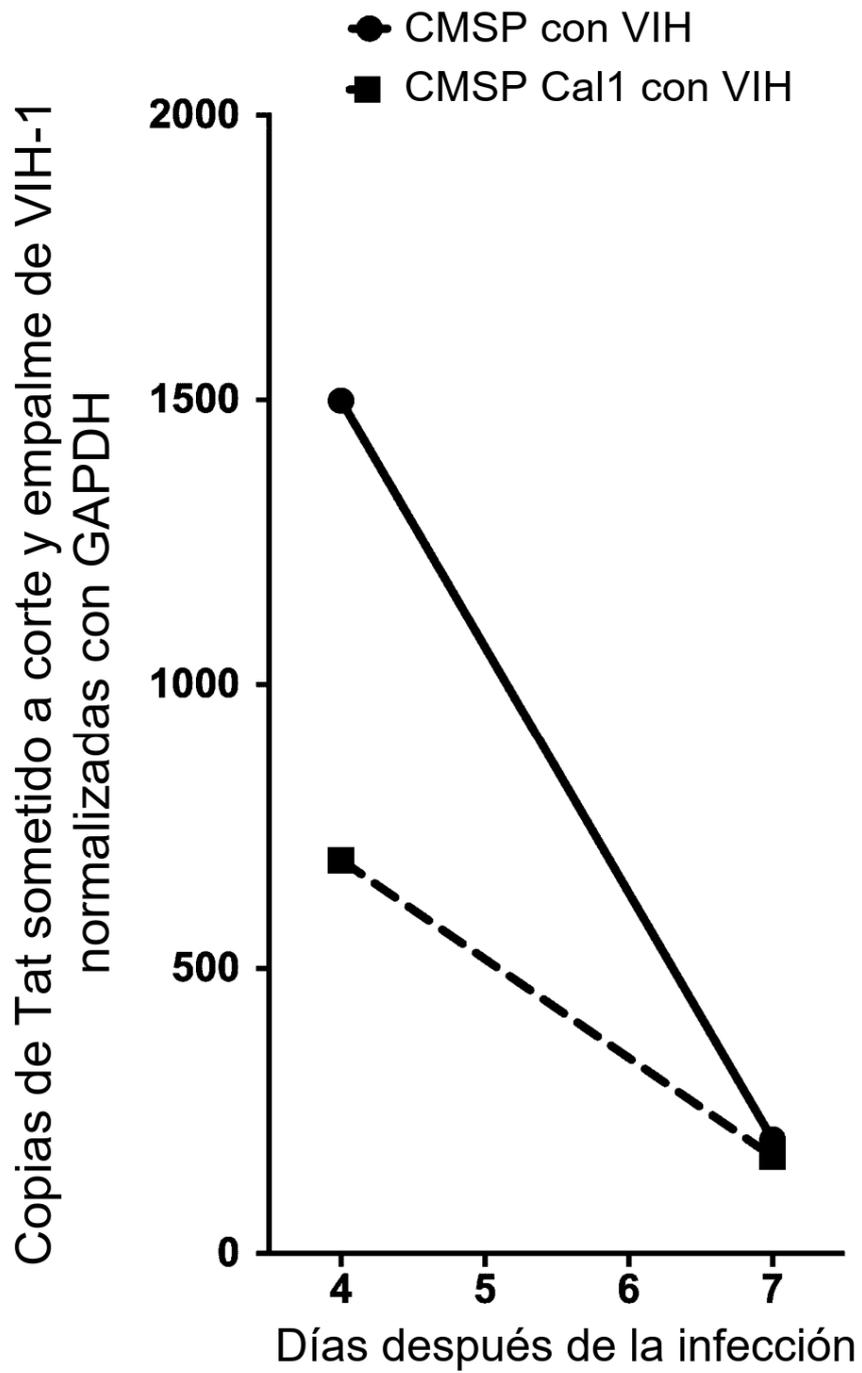


FIG. 14D

Mezcla maestra
para Cal-1 y VIH-1

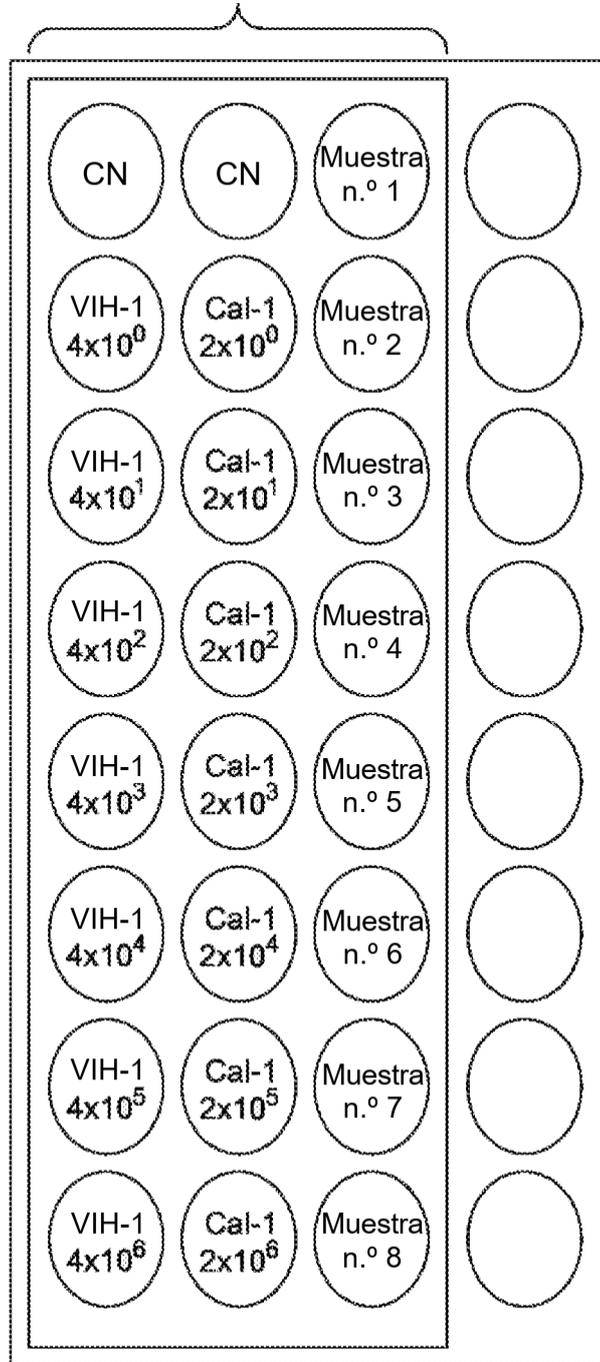


FIG. 15A

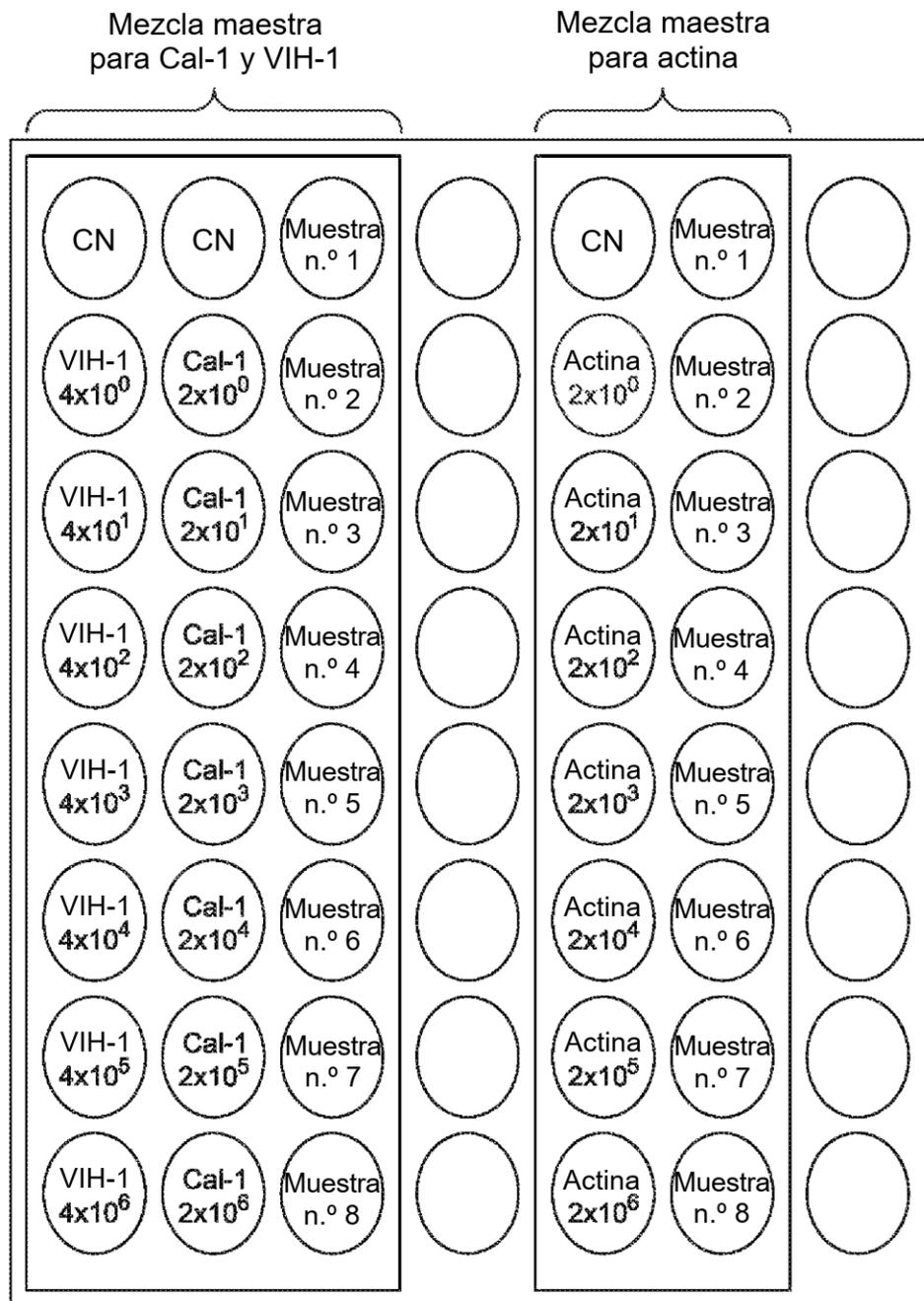


FIG. 15B

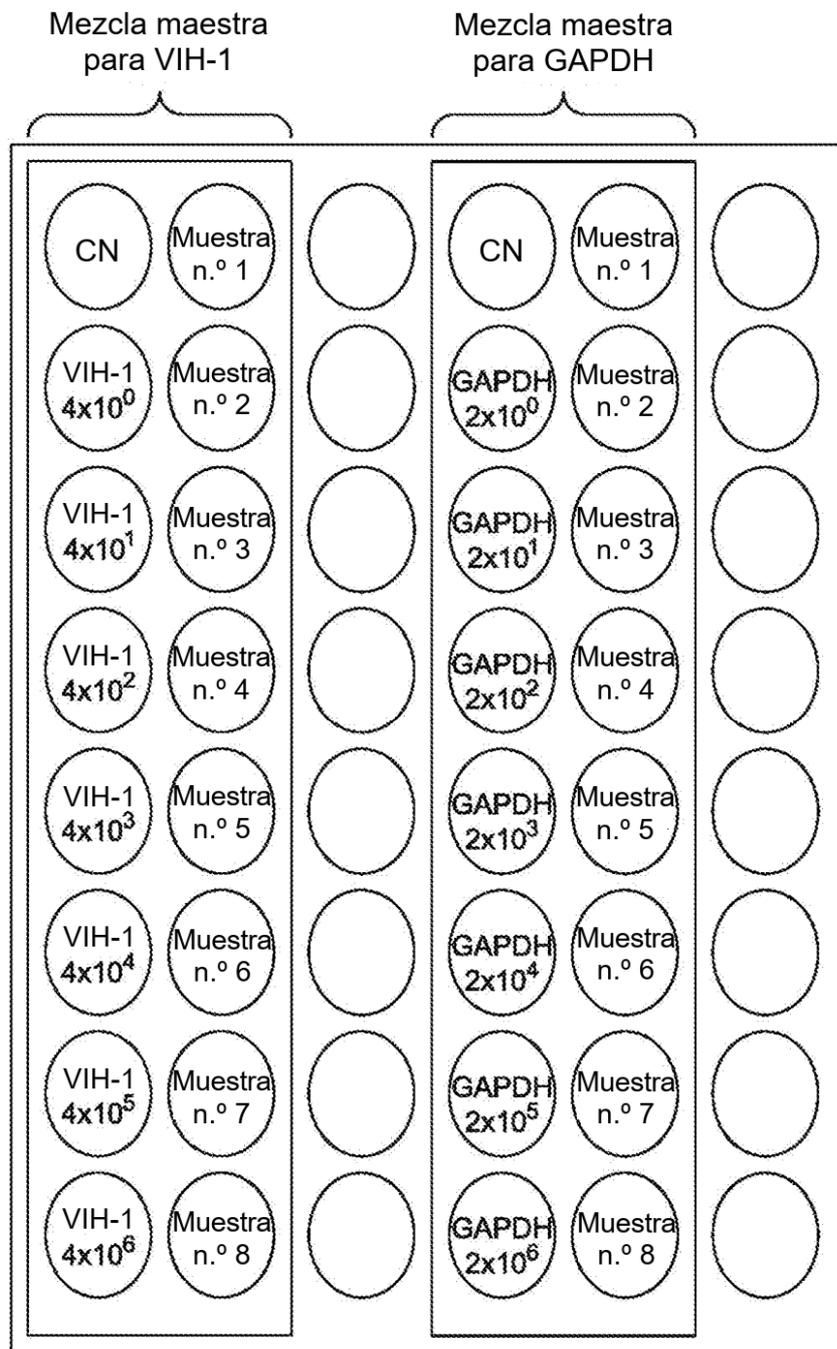


FIG. 15C

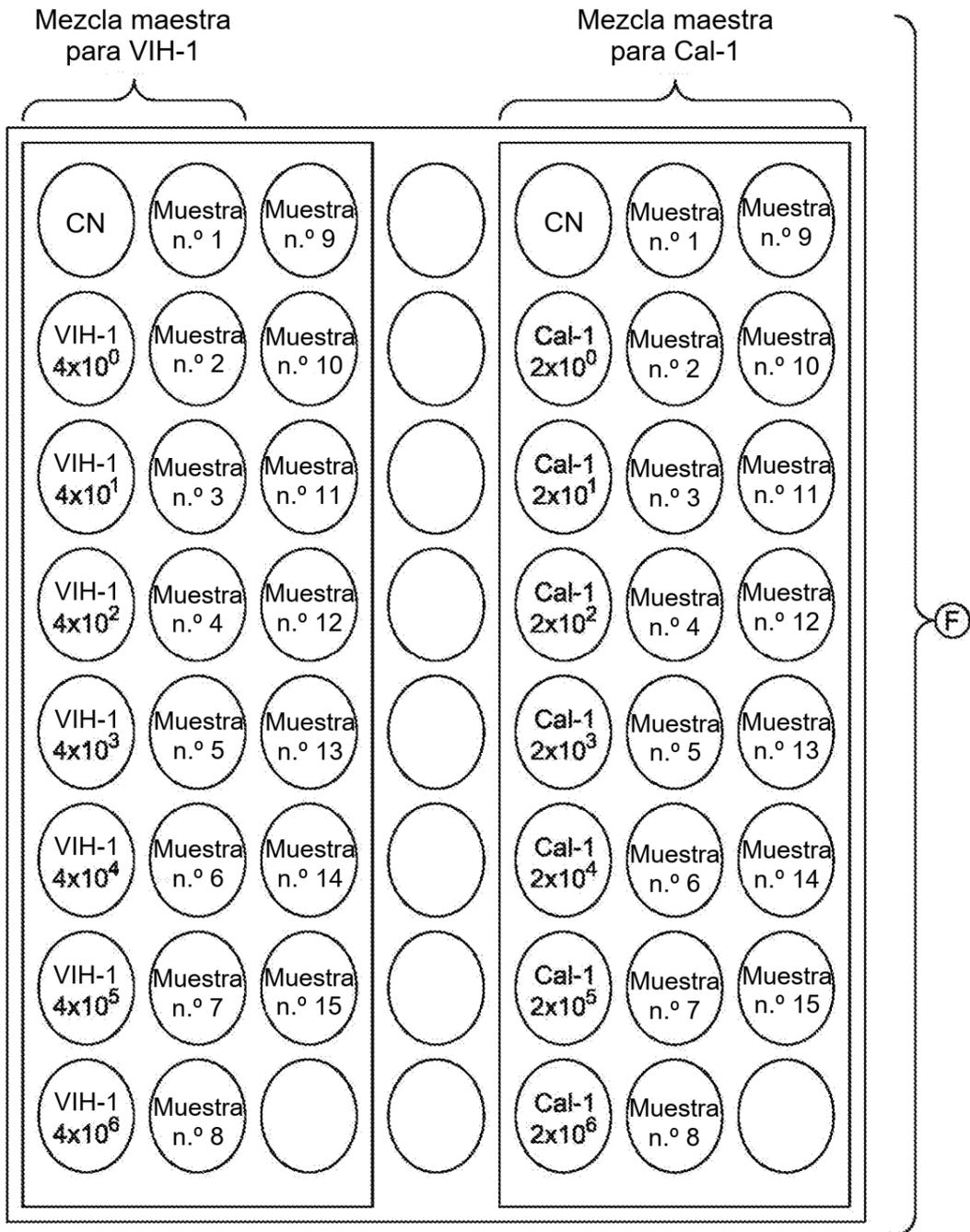


FIG. 15D

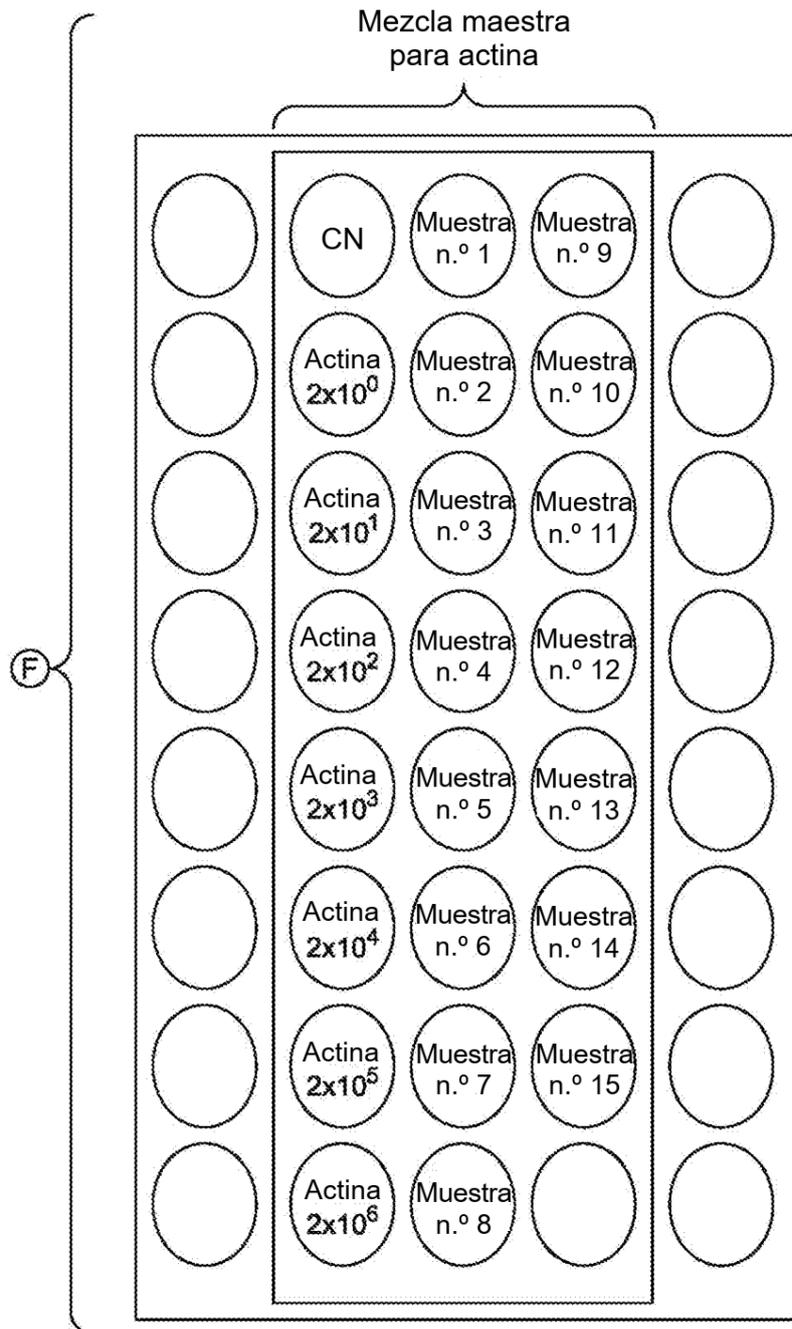


FIG. 15E