



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 307 726**

51 Int. Cl.:
C12N 15/86 (2006.01)
C07K 14/16 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/49 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02704755 .4**
96 Fecha de presentación : **13.03.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1373536**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.01.2004**

54 Título: **Construcciones de empaquetamiento lentiviral.**

30 Prioridad: **13.03.2001 US 275275 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2008

73 Titular/es: **Novartis AG.**
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH

72 Inventor/es: **Luo, Tianci;**
Plavec, Ivan;
Kaleko, Michael y
Douglas, Janet, Lynn

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 307 726 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

Construcciones de empaquetamiento lentiviral.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a nuevas construcciones de empaquetamiento lentiviral, líneas celulares de empaquetamiento estables, líneas celulares productoras estables y el uso de las mismas para producir vectores lentivirales recombinantes en células de mamífero.

10 Antecedentes de la invención

Los lentivirus son retrovirus complejos que, además de tener los genes retrovirales habituales gag, pol, env, contienen otros genes con una función reguladora o estructural. La mayor complejidad permite que el lentivirus module el ciclo vital en el transcurso de la infección latente. Un lentivirus habitual y bien caracterizado es el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), aunque sin embargo, también se han descrito varios lentivirus de animales.

Los vectores virales derivados de lentivirus son una herramienta útil para la liberación de genes. La capacidad de vectores lentivirus para liberar un gen en un amplio rango de células somáticas de roedor, primate y humano hace que estos vectores sean adecuados para la transferencia de genes a una célula con fines de terapia génica. Los lentivirus pueden infectar células diferenciadas terminalmente que raramente se dividen, tales como neuronas y macrófagos, lo que los hace particularmente útiles para ciertas aplicaciones de terapia génica que requieren la transducción de células no divisoras.

Para producir vectores lentivirales recombinantes, se utilizan líneas celulares de empaquetamiento que suministran en trans las proteínas necesarias para producir viriones infecciosos. Una consideración importante en la construcción de líneas celulares de empaquetamiento retroviral es la producción de sobrenadantes de vectores de título elevado libres de retrovirus de replicación competente recombinante (RCR). Una estrategia para minimizar la probabilidad de generar RCR en las células de empaquetamiento es dividir las funciones de empaquetamiento en por lo menos dos construcciones, por ejemplo, una que expresa los productos génicos de gag y pol y otra que expresa el producto génico de env. Esta estrategia minimiza la capacidad de co-empaquetamiento y la posterior transferencia de los dos genomas, así como la disminución significativa de la frecuencia de recombinación entre los genomas virales en la célula de empaquetamiento para producir RCR. En el caso que aparezcan recombinantes, se pueden configurar mutaciones y eliminaciones en los productos génicos no deseados para hacer que los posibles recombinantes no sean funcionales. Además, la eliminación del LTR en 3' en las construcciones de empaquetamiento reduce adicionalmente la capacidad de formar recombinantes funcionales.

Mochizuki *et al.*, 1998, J. Virol., Vol. 72, No. 11, pág. 8873-8883, describe sistemas de vectores basados en VIH-1 para liberar genes a células no divisoras.

Rosé *et al.*, 1995, J. Virol., Vol. 69, No. 5, pág. 2751-2758, describe actividad proteasa de VIH-1 de los mutantes de proteasa T26S y A28S.

Konvalinka *et al.*, 1995, J. Virol., Vol. 69, No. 11, pág. 7180-7186, describe una mutación en sitio activo en el sitio activo Asp-Thr-Gly de proteinasa de VIH-1.

WO 98/39463 describe vectores retrovirales que infectarán y conferirán transferencia génica a células no divisoras.

Berkowitz *et al.*, 1998, J. Virol., Vol. 69, No. 7, pág. 3371-3382, describe la construcción y el análisis molecular de los sistemas de transferencia de genes derivados del virus de inmunodeficiencia bovino.

Uno de los obstáculos principales hallados en la técnica cuando se produce una línea celular de empaquetamiento de base lentiviral estable es la incapacidad para mantener los niveles elevados de expresión de proteínas Gag/Pol. Esto podría ser debido a la toxicidad inherente de algunas proteínas lentivirales o a la menor expresión de proteínas a partir del silenciamiento del promotor. Por consiguiente, los sistemas de empaquetamiento conocidos actualmente en la técnica son sistemas de empaquetamiento transitorios o utilizan promotores inducibles para minimizar los problemas de toxicidad (Naidini *et al.*, Science 272: 263-267, 1996; Kafri *et al.*, Journal of Virology, 73: 576-584, 1999). Sin embargo, estas estrategias no son aconsejables ya que requieren un considerable esfuerzo y tiempo para la producción de vectores lentivirales. Además, los grupos de vectores obtenidos a partir de dichos sistemas mostrarán una mayor variabilidad en comparación con grupos que se obtendrán a partir de líneas celulares de empaquetamiento estables. Además, es difícil escalar la producción de vectores lentivirales a partir de un sistema transitorio.

Descripción resumida de la invención

La presente invención proporciona nuevas construcciones de empaquetamiento lentivirales, tal como se define en las reivindicaciones, que son útiles para el establecimiento de líneas celulares de empaquetamiento estables y líneas celulares productoras. En particular, la presente invención proporciona nuevas líneas celulares de empaquetamiento que son capaces de expresar de manera constitutiva niveles elevados de proteínas lentivirales, tales como, por ejemplo,

ES 2 307 726 T3

la proteína gag p24 de VIH en el caso de una línea celular de empaquetamiento de base VIH, o de proteína RT de BIV en el caso de una línea celular de empaquetamiento de base BIV.

5 En un aspecto, la presente invención proporciona una construcción de empaquetamiento lentiviral tal como se define en las reivindicaciones.

En otro aspecto, se proporciona una línea celular de preempaquetamiento estable que comprende la construcción de empaquetamiento de la presente invención.

10 En un aspecto adicional, se proporciona una línea celular de empaquetamiento estable que comprende la construcción de empaquetamiento de la presente invención y que comprende además un plásmido que comprende un gen env, así como una línea celular productora que comprende adicionalmente un vector plásmido lentiviral.

15 En otro aspecto adicional, se proporciona una partícula de vector lentiviral obtenida de la línea celular productora estable de la presente invención, en la que la partícula lentiviral es tal como se define en las reivindicaciones.

20 También se proporciona un procedimiento para la producción de un preparado de partículas de vector lentiviral que comprende las etapas de transfección de la línea celular de empaquetamiento estable de la presente invención con un vector plásmido lentiviral, la propagación de la línea celular obtenida de esta manera en un medio de cultivo adecuado y la obtención de un preparado de partículas de vector lentiviral a partir de dicho medio de cultivo.

Descripción de las figuras

25 La figura 1 muestra vectores de base VIH de la presente invención en una vista esquemática: La figura 1A muestra una serie de construcciones de empaquetamiento: pHIV $\Delta\Psi$; p $\Delta V\Delta R$ que tiene además una eliminación de vif y vp; p $\Delta V\Delta R$ -PR* que tiene además una mutación puntual en el sitio activo de proteasa; p $\Delta V\Delta R$ -SAR y p $\Delta V\Delta R$ -PR*-SAR que incluyen además el elemento SAR de interferón β . La figura 1B muestra el vector de transferencia PHLEIP. La figura 1C muestra las construcciones de la envoltura útiles para el pseudotipado.

30 La figura 2 es un gráfico que compara la producción viral, medida mediante los niveles de p24 de VIH, de las diferentes líneas celulares de empaquetamiento de VIH en el tiempo (aproximadamente 12 semanas).

La figura 3 muestra un esquema de pCllgpSyn.

35 Descripción detallada de la invención

La práctica de la presente invención utilizará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología celular, biología molecular, cultivo celular, virología y similares que son habituales para un experto en la materia. Estas técnicas están descritas con detalle en la bibliografía actual y se hace especial referencia a Sambrook, 40 Fritsch y Maniatis eds., "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Cells J. E. "Cell Biology, a Laboratory Handbook" Academic Press, Inc (1994) y Bahnson *et al.*, J. of Virol. Methods, 54: 131-143 (1995).

45 Todas las publicaciones solicitudes de patente citadas en esta memoria son indicativas del nivel de conocimiento del experto en la materia al que se refiere esta invención.

50 La presente invención se refiere a nuevas construcciones de empaquetamiento de base lentiviral que son útiles para el establecimiento de líneas celulares de empaquetamiento estables y líneas celulares productoras. Sorprendentemente, se ha observado que las mutaciones el sitio activo del respectivo gen de proteasa lentiviral permiten la construcción de vectores de empaquetamiento lentivirales que son útiles para establecer líneas de empaquetamiento estables para la producción de vectores lentivirales.

55 El centro catalítico de la proteasa de VIH incluye un motivo de tres aminoácidos, Asp-Thr-Gly (Konvalinka, J. *et al.*, J Virol. 69, 7180-7186, 1995). Estos tres aminoácidos se conservan entre los extractos de VIH y SIV descritos hasta ahora (Korber B, Theiler J, Wolinsky S Science 9 de junio de 1998, 280: 5371 1868-71). Konvalinka *et al.* mutaron el residuo de Thr (correspondiente al número de aminoácido 26 desde el inicio de la proteasa en el extracto HXB2 de VIH) por una Ser. Observaron que la proteasa de VIH mutada tiene una toxicidad significativamente reducida a la vez que se conserva la actividad proteasa.

60 Se ha observado sorprendentemente que esta información posibilita la generación de una línea celular estable para expresar niveles elevados de proteínas Gag/Pol lentivirales. La expresión de estas proteínas es absolutamente necesaria con el fin de establecer una línea celular de empaquetamiento estable para vectores lentivirales, en particular para vectores lentivirales de base VIH o BIV.

65 Además, sorprendentemente, en la presente invención se observó que el motivo Asp-Thr-Gly también está presente en la proteasa de BIV en el mismo punto. Una comparación de los primeros 29 aminoácidos de proteasas de VIH y BIV revela que los aminoácidos número 25 a 29 son idénticos entre las proteasas de VIH y BIV, incluyendo dicho motivo Asp-Thr-Gly:

ES 2 307 726 T3

Proteasa de VIH (HXB2):

1-PQVTLWQRPLVTIKIGGQLKEALLDTGAD (SEC ID No. 1)

5

Proteasa de BIV (extracto 127):

1-SYIRLDKQPFIKVFIGGRWVKGLVDTGAD (SEC ID No. 2)

10

Proteasa de VIH mutada

1-PQVTLWQRPLVTIKIGGQLKEALLDSGAD (SEC ID No. 3)

15

Proteasa de BIV mutada

1-SYIRLDKQPFIKVFIGGRWVKGLVDSGAD (SEC ID No. 4)

20

Por consiguiente, en una realización, la presente invención proporciona una mutación de Thr a Ser en la proteasa del extracto 127 de BIV en el aminoácido número 26 desde el inicio de la proteasa (SEC ID No. 4) para generar una proteasa de BIV menos tóxica en comparación con la proteasa de BIV natural. A continuación, se pueden generar una línea celular de empaquetamiento estable de base BIV, para la producción de vectores lentivirales de base BIV, que expresan Gag/Pol de BIV con esta mutación puntual en la región codificante de proteasa. Dicha línea celular de empaquetamiento estable permite el desarrollo de una línea celular productora de vectores lentivirales de BIV.

25

En una realización de la presente invención, se observa que la combinación de la inclusión de genes de proteasa que tienen mutaciones en su sitio activo con la inclusión de elementos SAR en la construcción de empaquetamiento lentiviral puede proporcionar resultados particularmente ventajosos. Dichas líneas celulares de empaquetamiento son capaces de expresar de manera constitutiva niveles particularmente elevados de proteínas lentivirales, tales como por ejemplo la proteína Gag p24 de VIH. Se requiere un nivel elevado de Gag (> 5 ng/ml p24) para una línea celular de empaquetamiento estable para producir títulos eficaces. Preferiblemente, la línea celular de empaquetamiento estable produce > 100 ng/ml de p24 y más preferiblemente > 1 µg/ml p24.

35

En una realización, la presente invención proporciona una serie de construcciones de empaquetamiento de base VIH. Estas construcciones de empaquetamiento se transfectan en líneas celulares adecuadas (figura 1A). La construcción original, pHIVΔΨ, se ha utilizado ampliamente para la producción transitoria de sobrenadante de vectores que han sido muy eficaces en la transducción de una variedad de células y tejidos diana. La primera modificación introducida con el fin de hacer que la construcción de empaquetamiento sea más adecuada para la producción de vectores estables es la eliminación de dos proteínas accesorias, vif y vpr, para fabricar pΔVΔR. Ninguna de estas proteínas es necesaria para la producción de vectores (Zufferey *et al.*, Nature Biotechnology, 15: 871-875, 1997) y se ha observado que vpr es citoestática y podría evitar la producción de una línea celular productora estable (Rogel, M. E. *et al.*, J. Virol. 69: 882-888, 1995). Para limitar adicionalmente la potencial toxicidad de la construcción, se introduce una mutación puntual en el sitio activo de la proteasa para producir pΔVΔR-PR*. Se ha descrito que esta mutación reduce la citotoxicidad causada por proteasa, pero aún permite las funciones de procesamiento virales normales (Konvalinka, J. *et al.*, J. Virol. 69: 7180-7186, 1995).

40

45

En una realización particular de la presente invención, una modificación adicional para mejorar la expresión estable de las proteínas Gag/Pol de VIH es la introducción del elemento SAR del interferón β (Klehr, D *et al.*, Biochemistry, 30: 1264-1270, 1991). Por ejemplo, dicha modificación da lugar a dos vectores, pΔVΔR-SΔR y pΔVΔR-PR*SAR.

50

Se analizan las construcciones de empaquetamiento en su capacidad para empaquetar un vector de expresión de EGFP y transducir células 293T en el ensayo transitorio tal como se describe en los ejemplos siguientes.

55

Todos los sobrenadantes de los vectores que se han generado con la utilización de estas construcciones muestran una eficacia de transducción mayor del 90% medida mediante análisis FACS para la expresión de EGFP, indicando que las modificaciones descritas anteriormente no perjudican a las funciones de empaquetamiento normales. Por consiguiente, se observa que las líneas celulares de empaquetamiento estables se pueden obtener si la construcción de empaquetamiento contiene una mutación en el sitio activo en la proteasa que evita la toxicidad y un elemento SAR. El elemento SAR puede servir para reducir el silenciamiento del promotor, aunque los Solicitantes no desean relacionarlo con ninguna especulación teórica en cuanto a la explicación mecanística de la invención descrita.

60

Por consiguiente, en un aspecto, la presente invención proporciona una construcción de empaquetamiento lentiviral tal como se define en las reivindicaciones.

65

Una “construcción de empaquetamiento” lentiviral, también referido algunas veces como construcción auxiliar, se refiere a un montaje que es capaz de dirigir la expresión de una o más secuencias de nucleótidos lentivirales que

proporcionan en *trans* las proteínas necesarias para obtener partículas de vectores lentivirales. En una realización de la presente invención, la secuencia de nucleótidos incluye por lo menos el gen gag y/o el gen pol de un lentivirus; un promotor unido operativamente a las secuencias de nucleótidos respectivas y en general una secuencia de poliadenilación localizada en dirección 3' de las respectivas secuencias de nucleótidos que codifican los genes gag y/o pol. La secuencia de poliadenilación, por ejemplo, puede derivar del virus de Simio 40 (SV40).

Una mutación "correspondiente a" una sustitución de T26S en la proteasa lentiviral codificada puede ser la propia sustitución de T26S, que es la sustitución preferida de la presente invención, o una sustitución que tiene un efecto biológico equivalente. "Efecto biológico equivalente" significa una sustitución que da lugar a una pérdida similar de citotoxicidad de proteasa que la propia sustitución de T26S, manteniendo un nivel similar de actividad proteasa viral que la propia sustitución de T26S. La citotoxicidad se puede medir tal como se describe en Konvalinka, J. *et al.*, J. Virol. 69: 7180-7186, 1995, en particular se puede utilizar la división de vimentina como marcador de la citotoxicidad. La "actividad de proteasa viral" se puede medir tal como se describe en Konvalinka, J. *et al.*, J. Virol. 69: 7180-7186, 1995. En particular, la división de poliproteínas asociadas a partículas en el virus que tiene la mutación a evaluar es una medida adecuada para la actividad proteasa viral. Las actividades y citotoxicidades son "similares" en el sentido de la presente invención cuando la diferencia con respecto a las medidas para la sustitución de T26S bajo esencialmente las mismas condiciones experimentales es inferior a 2 veces, preferiblemente inferior a 1,5 veces o incluso inferior a 1,2 veces.

En general, en el sentido de la presente invención, los lentivirus son retrovirus exógenos, no oncogénicos e incluyen, pero no se limitan a virus de la anemia infecciosa equina (EIAV; Patente de Estados Unidos No. 6.277.633), virus de inmunodeficiencia de simio (SIVs), visna y virus de neumonía progresiva de oveja, virus de inmunodeficiencia felina (FIV), virus de inmunodeficiencia bovina (BIV) y virus de inmunodeficiencia humana (VIH-1 y VIH-2).

El genoma lentiviral incluye tres genes hallados en retrovirus: gag, pol y env, que están flanqueados por dos secuencias de repetición terminal larga (LTR). El gen gag codifica las proteínas estructurales internas, tales como las proteínas de la matriz, la cápside y la nucleocápside; el gen pol codifica la ADN polimerasa dirigida a ARN (transcriptasa inversa (RT)), una proteasa y una integrasa; y el gen env codifica las glicoproteínas de la envoltura viral. Las LTR en 5' y 3' sirven para activar la transcripción y poliadenilación de los ARN de virión. La LTR contiene todas las otras secuencias que actúan en cis necesarias para la replicación viral. Los lentivirus pueden tener genes adicionales, incluyendo vif, vpr, tat, rev, vpu, nef y vpx (en VIH-1, VIH-2 y/o SIV). Junto a la LTR en 5' están las secuencias necesarias para la transcripción inversa del genoma, tales como el sitio de unión del ARN cebador, y para la encapsidación eficaz del ARN viral en las partículas, tales como el sitio Psi. Si las secuencias necesarias para la encapsidación no se encuentran en el genoma viral, dicho efecto cis evitará la encapsidación del ARN genómico. Sin embargo, el mutante resultante sigue siendo capaz de dirigir la síntesis de todas las proteínas virales.

En una realización de la presente invención, la construcción de empaquetamiento de la invención comprende un gen gag lentiviral. El gen gag es el gen mayoritario en 5' en genomas retrovirales y, ya tal como se ha descrito en detalle anteriormente, codifica proteínas estructurales que son necesarias para formar la partícula del virus. El gen gag se traduce para producir una poliproteína precursora que posteriormente se divide para producir de tres a cinco proteínas estructurales. En una realización preferida, se recodifica en gen gag.

Un gen que se "recodifica" se refiere a un gen o genes que son alterados de manera que el polipéptido codificado por un ácido nucleico permanece igual que la secuencia inalterada, pero cambia la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido. En la técnica se sabe que debido a la degeneración del código genético, existen múltiples codones de ADN y ARN que pueden codificar el mismo producto de traducción de los aminoácidos. Por ejemplo, en una realización, una secuencia de ADN que codifica los genes gag y/o pol de BIV se "recodifica", de manera que se altera la secuencia de nucleótidos, pero la secuencia de traducción de aminoácidos para los polipéptidos GAG y POL permanece idéntica a la secuencia de aminoácidos natural. Además, también se sabe que diferentes organismos tienen diferentes preferencias para la utilización de codones particulares para sintetizar un aminoácido.

En una realización preferida de la presente invención, la construcción de empaquetamiento de la invención se deriva del genoma de VIH. En una realización particularmente preferida, la construcción de empaquetamiento comprende además una mutación en un gen vif o vpr de VIH. Realizaciones más particularmente preferidas de la presente invención son la construcción p Δ V Δ R-PR* y la construcción p Δ V Δ R-PR*SAR tal como se describen en los Ejemplos siguientes.

En una realización preferida, la construcción de empaquetamiento se deriva del genoma de BIV. La organización genómica básica de BIV se describe en Garvey *et al.*, (Virology, 175: 391-409, 1990) y la Patente de Estados Unidos No. 5.380.830. Adicionalmente, se describen procedimientos de obtención de ADN genómico de BIV y células infectadas por BIV. Las secuencias que codifican BIV y plásmidos que contienen genomas retrovirales adecuados para su uso en la preparación de las construcciones de vectores se pueden obtener fácilmente a partir de la descripción facilitada en la presente invención o a partir de depósitos o bases de datos, tales como la American Type culture collection (ATCC), por ejemplo, ATCC de número de acceso No. 68092 y ATCC de número de acceso 68093 y GENBANK. Los vectores basados en BIV se describen en la solicitud de PCT WO 01/44458.

Los genes gag y pol están en diferentes marcos y solapamientos. Los genes pol y env están en el mismo marco de lectura y están separados por "la región central". Existen cinco marcos de lectura abiertos (ORFs) que se encuentran

en la región central. Tres de éstos tienen una estructura similar a los exones para vif, tat y rev de VIH y otros lentivirus. Los otros dos ORFs se sitúan en una posición en la región central análoga a los ORFs codificantes de vpr, vpx y vpu de VIH-1 y/o VIH-2. El ORF de nef que se sitúa después de env en los genomas de otros lentivirus parece estar ausente en BIV.

Se entenderá que para la secuencia de nucleótidos del genoma de BIV, pueden existir variaciones naturales entre virus individuales de BIV. Estas variaciones pueden dar lugar a eliminaciones, sustituciones, inserciones, inversiones o adiciones de uno o más nucleótidos, siempre y cuando no se pierda la función del gen reivindicada. Las secuencias de ADN que codifican dichas variantes se pueden crear mediante procedimientos de clonación estándar o reacción en cadena de la polimerasa (PCR), véase las Patentes de Estados Unidos Nos. 4.683.195 y 4.683.202. La presente invención se refiere a un segmento de ácido nucleico del genoma de un BIV obtenible de cualquier cepa o clon de BIV. En una realización de la presente invención, la construcción del vector de BIV de la presente invención incluye un número suficiente de nucleótidos correspondientes a los nucleótidos del genoma de BIV para expresar uno o más genes de BIV funcionales.

En una realización preferida, la construcción de empaquetamiento derivado de BIV de la presente invención puede comprender una mutación, incluyendo la eliminación de todos o parte de, un gen vif, W, Y o tat de BIV.

El gen Rev de BIV y el elemento de respuesta a Rev (RRE) también se puede mutar o eliminar si se utiliza el Elemento de Transporte Constitutivo (CTE) en el vector de BIV de la presente invención.

En una realización adicional de la presente invención, el vector lentiviral de la presente invención comprende una región de unión en andamio de ADN (SAR), que tal como se define de manera amplia en la presente invención, se refiere a una secuencia de ADN que tiene afinidad o capacidad de unión intrínseca para el andamio o la matriz nuclear. Particularmente preferido es un elemento IFN-SAR y lo más preferido es un elemento β -IFN-SAR. Los elementos SAR tienen habitualmente 100 a 300 o más pares de bases de largo y pueden requerir redundancia en la información de la secuencia y contener múltiples sitios de interacción proteína-ADN. Los elementos SAR son elementos de ADN que se unen al andamio o matriz nuclear aislado con afinidad elevada (Cockerill, P.N. y Garrard, W.T. (1986). *Cell* 44: 273-282, Gasser, S.M. y Laemmli, U.K. (1986). *Cell* 46: 521-530). Se ha observado que algunas de las secuencias SAR tienen actividades potenciadoras (Phi-Van, L. *et al.* (1990) *Mol. Cell Biol.* 10: 2302-2307, McKnight, R.A., *et al.*, (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 6943-6947) y algunas sirven como elementos que actúan en cis impulsando la desmetilación específica de células B en el locus k de inmunoglobulina (Lichtenstein, M. *et al.*, (1994) *Cell* 76: 913-923, Kirillov, A. *et al.*, (1996) *Nat. Genet.* 13: 435-441). El elemento SAR hIFN- β inhibe la metilación de novo de la LTR en 5' y parece aislar el transgén de la influencia de la cromatina del huésped flanqueante en el sitio de integración viral. De este modo, disminuyen los efectos de posición. Los elementos SAR se pueden obtener, por ejemplo, de eucariotas incluyendo mamíferos, plantas, insectos y levadura, preferiblemente mamíferos. Ejemplos de protocolos adecuados para identificar elementos SAR para su uso en la presente invención se describen en WO96/19573.

Preferiblemente, los elementos SAR deberían situarse en dirección 3' desde el transgén y la secuencia de env lentiviral. En una realización, se puede insertar más de un elemento SAR en el vector de empaquetamiento de la presente invención. Aunque los solicitantes no pretenden unirse a ninguna especulación mecanística, el uso de elementos SAR flanqueantes en las moléculas de ácido nucleico pueden permitir a los elementos SAR formar un bucle o dominio de cromatina independiente, que se aísla de los efectos de la cromatina próxima.

Se pueden utilizar otros procedimientos adicional o alternativamente a la utilización de elementos SAR. Entre estos procedimientos se incluyen la integración de la construcción de expresión de gag/pol en una región altamente expresada de un cromosoma o un gen altamente expresado. Entre estas regiones altamente expresadas se incluyen, pero no se limitan a, SARs, regiones de control de locus (LCRs), y regiones de aislante (Emery *et al.*, *PNAS*, 97 (16): 9150-9155 (2000)). Será evidente para un experto en la materia que existen varios procedimientos que se pueden utilizar para integrar una construcción de expresión de gag/pol en una región o gen altamente expresados (por ejemplo, recombinación homóloga).

En un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona una línea celular de preempaquetamiento estable que comprende la construcción de empaquetamiento de la presente invención. Las líneas celulares de preempaquetamiento particularmente preferidas son las líneas celulares que son capaces de expresar de manera estable por lo menos 5 ng/ml de la proteína p24 de VIH, o por lo menos 5 ng/ml de proteína de transcriptasa inversa (RT) de BIV, y en las que expresión de proteínas es constitutiva. Preferiblemente, se producen 50 ng/ml de RT de BIV. Más preferiblemente, se producen 500 ng/ml de RT de BIV.

En un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona una línea celular de empaquetamiento estable que comprende la construcción de empaquetamiento de la presente invención y que comprende además un plásmido que comprende un gen env. Por consiguiente, una "línea celular de empaquetamiento", en el sentido de la presente invención, es una línea celular recombinante que contiene secuencias de ácido nucleico que expresan proteínas estructurales Gag, Pol y Env retrovirales. Dado que la línea celular de empaquetamiento carece de la secuencia de ácido nucleico retroviral de la señal de empaquetamiento y otros elementos que actúan en cis, no se pueden producir los viriones infecciosos.

El gen "env" codifica las proteínas de envoltura. Tal como se utiliza en la presente descripción, el gen env incluye no solamente la secuencia del gen env natural, sino también modificaciones en el gen env que incluyen modificaciones que alteran la especificidad diana de retrovirus y lentivirus o genes env que se utilizan para generar retrovirus/lentivirus pseudotipados ("pseudotyped"), a los que se hace referencia en las Publicaciones PCT WO 92/14829, WO 94/11524, WO 94/11524 y la Patente de Estados Unidos No. 6.004.798. El gen env puede derivar de cualquier virus, incluyendo retrovirus. Env es preferiblemente una proteína de envoltura anfotrópica que permite la transducción de células humanas y de otras especies. Puede desearse dirigir el virus recombinante mediante la unión de la proteína de envoltura con un anticuerpo o un ligando concreto para dirigirla a un receptor o un tipo de célula concreto. Mediante la inserción de una secuencia que incluye una región reguladora de interés en el vector viral, junto con un gen que codifica el ligando para un receptor en una célula diana específica, el vector se puede convertir en específico de la diana. Por ejemplo, se pueden fabricar vectores específicos de diana mediante la inserción de, por ejemplo, un glicolípido o una proteína. Además, el reconocimiento se puede realizar mediante la utilización de una parte de anticuerpo o molécula de tipo anticuerpo recombinante de unión a antígeno, tal como un anticuerpo de cadena única, para dirigir el vector retroviral. El experto en la materia conocerá, o puede deducir fácilmente sin una gran experimentación, procedimientos específicos para conseguir la liberación de un vector retroviral a una diana específica.

En general, las líneas celulares de la presente invención pueden incluir vectores separados que proporcionan las funciones de empaquetamiento de viriones recombinantes, tales como gag, pol, env, tat y rev, tal como se ha descrito anteriormente. No existe limitación en el número de vectores que se utilizan, siempre y cuando los vectores se utilicen para transformar y producir la línea celular de empaquetamiento para producir lentivirus recombinantes. Los vectores se introducen a través de la transfección o infección en la línea celular de empaquetamiento. La línea celular de empaquetamiento produce partículas virales que contienen el genoma del vector. Los procedimientos para la transfección o la infección son conocidos por los expertos en la materia. Después de la cotransfección de los vectores de empaquetamiento y el vector de transferencia a la línea celular de empaquetamiento, el virus recombinante se recupera del medio de cultivo y se titula mediante procedimientos estándar utilizados por los expertos en la materia. De esta manera, las construcciones de empaquetamiento se pueden introducir en líneas celulares humanas mediante, por ejemplo, transfección con fosfato cálcico, lipofección o electroporación, generalmente junto con un marcador seleccionable dominante, tal como neo, DHFR, Gln sintetasa o ADA, seguido de la selección en presencia del fármaco apropiado y el aislamiento de clones.

En una realización preferida, la línea celular de empaquetamiento de la presente invención incluye el gen env para VSV-G. Aunque la proteína VSV-G proviene de un gen env deseable ya que VSV-G confiere un amplio rango de huéspedes en el virus recombinante, VSV-G puede ser perjudicial para la célula huésped. De este modo, cuando se utiliza un gen tal como para VSV-G, es preferible utilizar un sistema de promotores inducibles, de manera que se pueda regular la expresión de VSV-G para minimizar la toxicidad del huésped cuando no es necesaria la expresión de VSV-G. Por ejemplo, se puede utilizar el sistema de expresión del gen regulable de la tetraciclina de Gossen y Bujard (Proc. Natl. Acad. Sci. (1992) 89: 5547-5551) para proporcionar la expresión inducible de VSV-G. El transactivador tet/VP16 puede estar presente en un primer vector y la secuencia codificante de VSV-G se puede clonar en dirección 3' desde un promotor controlado por las secuencias operadoras tet en otro vector. Otros ejemplos no limitantes de sistemas de expresión regulables se describen en las Publicaciones PCT WO 01/30843 y WO 02/06463.

En otra realización preferida, la línea celular de empaquetamiento de la presente invención incluye el gen env mutante de LCMV (Beyer *et al.*, J. Virol., 76: 1488-1495). En una realización, el gen env mutante de LCMV se expresa de manera constitutiva. En otra realización, el gen env mutante de LCMV se expresa a partir de un promotor inducible. Los sistemas de promotores inducibles se describen anteriormente en la presente invención.

En un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona una línea celular productora que comprende la construcción de empaquetamiento de la presente invención, un gen env y que comprende además un vector lentiviral, es decir, un vector que comprende una LTR en 5' lentiviral, una LTR en 3' lentiviral y una señal de empaquetamiento adecuada. Por consiguiente, una "línea celular productora" es una línea celular de empaquetamiento tal como se ha definido anteriormente que también contiene un vector lentiviral de replicación defectuosa que se empaqueta en la partícula viral. La célula productora produce partículas de base lentiviral que contienen genes heterólogos (es decir, no lentivirales), tales como genes terapéuticos o marcadores.

En una realización preferida, la línea celular productora de la presente invención se caracteriza además porque es capaz de producir un título de virus lentiviral de por lo menos $10E5$ cfu/ml y preferiblemente $\geq 10E6$ cfu/ml.

En otro aspecto, se proporciona una partícula de vector lentiviral obtenida de la línea celular productora estable de la presente invención. También se proporciona un procedimiento para producir un preparado de partículas de vector lentiviral que comprende las etapas de transfectar la línea celular de empaquetamiento estable de la presente invención con un vector lentiviral, aislar y propagar y una línea celular productora en un medio de cultivo adecuado y obtener un preparado de partículas de vector lentiviral a partir de dicho medio de cultivo.

En general, los sobrenadantes virales se recogen utilizando técnicas estándar tales como la filtración de sobrenadantes en un punto de tiempo adecuado, tales como, por ejemplo, 48 horas después de la transfección. El título viral se determina mediante la infección de células adecuadas con una cantidad apropiada de sobrenadante viral. Por ejemplo, cuarenta y ocho horas más tarde, se ensaya la eficacia de la transducción. De este modo, la presente invención proporciona procedimientos y medios para producir partículas de vector lentiviral recombinantes de título elevado. Dichos

ES 2 307 726 T3

preparados de partículas se pueden utilizar posteriormente para infectar células diana utilizando técnicas conocidas en el sector.

Los siguientes ejemplos se proporcionan con el objetivo de ilustrar adicionalmente la presente invención y de ningún modo deben tomarse como limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1

Construcción de vector de empaquetamiento de base VIH

Los plásmidos de empaquetamiento utilizados en este estudio se representan en la figura 1A. pHIVΔΨ contiene la secuencia del extracto NL4-3 de VIH-1 con eliminaciones de 1) ambas LTRs, 2) 33 pb de la señal de empaquetamiento (Ψ) 5' con respecto al gen gag, 3) 1587 pb del gen env, 4) el gen vpu y 5) el gen nef. El resto de genes no quedan afectados. La transcripción de los genes de VIH se encuentra bajo el control del promotor de Cytomegalovirus (CMV), derivado del vector pCI (Promega, WI). pHIVΔΨ es una modificación de pHIV-PV (Sutton, R. E., H. T. M. Wu, R. Rigg, E. Bohnlein, y P. O. Brown, 1998. 72: 5781-5788). Se eliminó un fragmento NdeI/SalI de 660 pb de pHIVΔΨ para eliminar vif y vpr, dando lugar a pΔVΔR. Se introdujo una mutación puntual (nt 2328, A a T) en el gen de proteasa de pΔVΔR utilizando mutagénesis de PCR para producir pΔVΔR-PR*. Esto corresponde a una sustitución del aminoácido Thr26 por Ser26. Los cebadores de PCR para la mutagénesis son los siguientes:

Cebador A: 5'-AATTGCAGGGCCCCTAGGAAAAA-3' (SEC ID No. 5)

Cebador B: 5'-TCTGCTCCTGAATCTAATAGCGCTT-3' (SEC ID No. 6)

Cebador C: 5'-AAGCGCTATTAGATTCAGGAGCAGA-3' (SEC ID No. 7)

Cebador D: CCATGTACCGGTTCTTTTAGAATC-3' (SEC ID No. 8).

Los cebadores B y C son complementarios y contienen la mutación A a T (nt 2328), que confiere la sustitución de aminoácido Thr por Ser y una mutación T a G (nt 2318), que introduce un sitio de restricción único Eco47III, pero no altera la secuencia de aminoácidos. El producto de la PCR amplificado a partir de los cebadores A y B se purificó y combinó con el producto purificado amplificado a partir de los cebadores C y D. A continuación, esta mezcla se amplificó con los cebadores A y D, se cortó con Apal y Agel (sitios de restricción presentes de forma natural en los cebadores) y, a continuación, se volvieron a clonar en pΔVΔR. La presencia de la mutación se confirmó mediante digestión con Eco4711 y el análisis de secuencia. La región de unión en andamio (SAR) de interferón β (fragmento de 800 p) (Agarwal, M., T. W. Austin, F. Morel, J. Chen, E. Böhnlein, y I. Plavec. 1998. 72: 3720-3728) se introdujo en un sitio de restricción NotI (nt 8800) para tanto pΔVΔR como pΔVΔR-PR* para crear pΔVΔR-SAR y pΔVΔR-PR*SAR, respectivamente. El vector de transferencia utilizado en estos estudios, pHLEIP, se muestra en la figura 1B. pHLEIP contiene secuencias del extracto NL4-3 de VIH-1 que incluyen 1) ambas LTRs, 2) 1251 bp del extremo 5' de gag, 3) 715 pb del extremo 3' de pol, que contiene el tracto central de polipurina (ppt) y las secuencias potenciadoras transcripcionales, 4) 311 pb que codifican los primeros exones de tat y rev, y 5) 977 pb de env que contenían el elemento de respuesta de REV (RRE) y el segundo exón de tat. Las secuencias que codifican nef y rev se rompen mediante la inserción del gen marcador egfp (Clontech, CA), seguido del sitio de entrada interno de ribosoma picomoviral (Jang, S. K., M. V. Davies, R. J. Kaufman, y E. Wimmer. 1989. J. Virol. 63: 1651-1660) y el gen puromicina N-acetiltransferasa (Vara, J. A., A. Portela, J. Ortin, y A. Jimenez. 1986. Nuc. Acids Res. 14: 4617-4624). La expresión de egfp está controlada por la LTR de VIH de manera dependiente con tat. Este vector es una modificación de pHIV-AP G-P-E-F-V (Sutton, R. E., H. T. M. Wu, R. Rigg, E. Bohnlein, y P. O. Brown. 1998. Journal of Virology. 72: 5781-5788). Las construcciones de envoltura utilizadas para el pseudotipado son pCIGL, que contiene el gen de VSV-G (Bums, J. C., T. Friedmann, W. Driever, M. Burrascano, y J.-K. Yee. 1993. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA. 90: 8033-8037; Yee, J. K., A. Miyanojara, P. LaPorte, K. Bouic, J. C. Burns, y T. Friedmann. 1994. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 91: 9564-9568) bajo el control del promotor de CMV de pCI, y pCMV*Ea, que contiene el gen de la envoltura del virus de la leucemia murina anfotrópica (A-MLV) clonado en pCI (Rigg, R. J., J. Chen, J. S. Dando, S. P. Forestell, I. Plavec, y E. Bohnlein. 1996. Virology. 218: 290-295) (Figura 1C).

Ejemplo 2

Análisis funcional de construcciones de empaquetamiento

Se realizó un ensayo de transición para verificar que las construcciones de empaquetamiento mantenían todas las funciones necesarias. Se generaron los primeros sobrenadantes virales mediante la transfección de células 293T (5×10^6) con 3 construcciones ($10 \mu\text{g}$ de construcción de empaquetamiento, $5 \mu\text{g}$ de construcción de envoltura, y $20 \mu\text{g}$

ES 2 307 726 T3

de vector de transferencia), mediante precipitación con Ca_2PO_4 (Clontech, CA). Los sobrenadantes de transfección se recogieron después de 24, 48 y 72 horas, se agruparon y se filtraron a través de un filtro de $0,45 \mu\text{m}$. Para determinar la eficacia de transducción, los sobrenadantes de los vectores recogidos se diluyeron 1:1 con medio de cultivo (DMEM más FBS al 10%), se añadieron a 2×10^5 células 293T en placas de 6 pocillos, y se centrifugaron a $2500 \times g$ en presencia de $8 \mu\text{g/ml}$ de sulfato de protamina (Sigma, MO). Este protocolo de transducción conocido como “espinoculación” (Bahnon, A. B., J. T. Dunigan, B. E. Baysal, T. Mohny, R. W. Atchison, M. T. Nimgaonkar, E. D. Ball, y J. A. Barranger. 1995, *J Virol Meth.* 54: 131-143) se realizó a 37°C durante 3-4 horas. Después de la espinoculación, se sustituyó el medio y las células se cultivaron a 37°C durante 48-72 h. Después de la incubación, las células se fijaron en formaldehído al 1-2% y se midió la expresión de EGFP mediante citometría de flujo en un FACScan (Becton Dickinson, MD).

Ejemplo 3

15 *Producción de líneas celulares productoras*

Para generar líneas celulares productoras de Gag/Pol, se pusieron en placas células 293 Ea6 (5×10^6) en una placa de 10 cm y se transfectaron con 2 construcciones ($10 \mu\text{g}$ de construcción de empaquetamiento y $1 \mu\text{g}$ de pCDNApuro) mediante precipitación con Ca_2PO_4 (Clontech, CA). El pCDNApuro es un plásmido que contiene el gen de puromicina N-acetiltransferasa impulsado por el promotor de CMV de pCDNA1.1/Amp (Invitrogen, CA). La línea celular 293 Ea6 expresa de manera constitutiva la envoltura de A-MLV (Rigg, R. J., J. Chen, J. S. Dando, S. P. Forestell, I. Plavec, y E. Bohnlein. 1996. *Virology.* 218: 290-295). Después de la transfección, las células se cultivaron durante 48 horas y, a continuación, se transfirieron a un medio que contenía $5 \mu\text{g/ml}$ de puromicina (Sigma, MO). Las células se mantuvieron bajo la selección por puromicina y se controlaron periódicamente para la producción de Gag a través de ELISA de p24 (Beckman/Coulter, CA). Para medir la producción de p24 de la línea celular, se pusieron en placas 1×10^6 células en un pocillo de una placa de 6 pocillos, se recogió el sobrenadante 24 horas después de la colocación en placas, se filtró a través de un filtro de $0,45 \mu\text{m}$ y, a continuación, se realizó el ensayo ELISA de p24. Se obtuvieron clones de células individuales a partir de la línea celular que expresaba el nivel más elevado de p24 mediante la clasificación en un FACStar (Becton Dickinson, MD). El vector de transferencia, pHLEIP, se introdujo en el clon con la producción más elevada estable de p24. Esto se consiguió mediante la transducción del clon con el sobrenadante del vector pHLEIP pseudotipado de VSV-G transitorio, tal como se ha descrito en la sección anterior. Los sobrenadantes de la línea de empaquetamiento resultante se recogieron en varios tiempos después de la transducción y se titularon en células 293T. Para la titulación, se pusieron en placas 2×10^5 células 293T en pocillos de una placa de 6 pocillos y se transdujeron, tal como se ha descrito previamente, con diluciones en serie de 10 veces de sobrenadante viral. Después de 48 horas de cultivo, se añadieron $5 \mu\text{g/ml}$ de puromicina al medio para la selección. A continuación, las células se mantuvieron en medio de selección durante 2 semanas. Las colonias supervivientes se fijaron y se tiñeron en una solución de azul de coomassie (50% de metanol, 0,05% de azul de coomassie brillante R-250, 10% de ácido acético) y se contaron para determinar el título.

40 Ejemplo 4

Evaluación de las construcciones de empaquetamiento para la producción de p24 estable

Para determinar si cualquiera de las construcciones de empaquetamiento modificadas podía conferir una expresión de proteínas Gag/Pol duradera altamente estables, se generaron líneas celulares estables basadas en 293 Ea6 y se controló la producción de partículas virales en intervalos regulares después de la selección tal como se describe en Materiales y Procedimientos. La figura 2 es un gráfico que compara la producción viral, medida mediante los niveles de p24, de las diferentes líneas celulares de empaquetamiento con el tiempo (aproximadamente 12 semanas). Tal como se esperaba, las células que contenían la construcción con vpr, pHIV $\Delta\Psi$, expresaron niveles bajos de p24 poco después de la selección y mediante el segundo pase, la expresión de p24 estaba por debajo del nivel de detección. La línea celular fabricada con la construcción con vpr eliminado, p $\Delta\text{V}\Delta\text{R}$, y las dos líneas celulares que contienen la mutación de proteasa, p $\Delta\text{V}\Delta\text{R}$ -PR* o la inserción SAR, p $\Delta\text{V}\Delta\text{R}$ -SAR presentó niveles de p24 iniciales más elevados (3-12 ng/ml), pero disminuyó hasta niveles inferiores a 1 ng/ml. De manera destacada, la línea celular que contenía la construcción con tanto la mutación de proteasa como con la inserción de SAR, p $\Delta\text{V}\Delta\text{R}$ -PR*SAR, mantuvo aproximadamente 4 veces más expresión de p24 que las células que contenían las construcciones con una única modificación. Estos resultados sugieren que la inhibición de tanto la toxicidad de proteasa como el silenciamiento del promotor puede aumentar los niveles y la estabilidad de la expresión de p24 en una línea celular, pero que una sola modificación no proporciona una mejora significativa.

60 Ejemplo 5

Análisis clonal de las construcciones de empaquetamiento modificadas

65 Aunque la línea celular que contenía la construcción doblemente modificada, p $\Delta\text{V}\Delta\text{R}$ -PR*SAR expresaba los niveles más elevados de p24 en comparación con las otras construcciones, estos niveles no son suficientes para generar una línea celular de empaquetamiento eficaz. Se aislaron clones de células individuales a partir de esta línea celular en

ES 2 307 726 T3

un intento por hallar un clon de producción elevada de p24. Tal como se muestra en la Tabla 1, la mayoría de clones expresaron niveles negligibles de p24, pero 2 de los 40 clones analizados expresaron niveles significativamente más elevados de p24 que la línea celular parental (10-100 ng/ml). Uno de estos clones (clon PR*SAR) expresó 100 ng/ml de p24 durante por lo menos 12 semanas. Para verificar la importancia de la mutación de proteasa para permitir una producción a nivel elevado de p24, también se obtuvieron clones de células individuales a partir de la línea celular que contenía pΔVAR-SAR y se analizó la producción de p24. La Tabla 1 muestra la comparación entre clones que contienen las construcciones de empaquetamiento +/- la mutación de proteasa. Ningún clon que contenía pΔVAR-SAR expresó niveles de p24 > 10 ng/ml incluso cuando se evaluaron casi el doble de clones en comparación con los que contenían pΔVAR-PR*SAR. Estos resultados confirman la importancia de la mutación de proteasa en la producción de células productoras a alto nivel de Gag/Pol.

TABLA 1

Análisis clonal que confirma la importancia de la mutación de la proteasa en la obtención de una línea celular productora de Gag a nivel elevado

Línea celular	Producción de p24 (ng/ml)			Total# de clones
	Nivel base*	1-10	10-100	
ΔVAR-PR*SAR	33	5	2	40
ΔVAR-SAR	71	5	0	76

*Nivel base es < 20 pg/ml p24

Ejemplo 6

Título del clon de células de empaquetamiento más productoras de Gag/Pol

Para determinar la eficacia de empaquetamiento y transferencia del vector por parte del clon de PR*SAR, se realizó un análisis por titulación. Se introdujo un vector pseudotipado de VSV-G producido de forma transitoria que contenía EGFP y un gen de resistencia a puromicina, pHLEIP, en el clon de la célula de empaquetamiento a través de la transducción, tal como se describe en Materiales y Procedimientos. Los sobrenadantes se recogieron a varios puntos de tiempo después de la transducción, se analizó la producción de p24, y se tituló en células 293T mediante FACS de EGFP y selección por puromicina. Tal como se muestra en la Tabla 2 Exp. 1, la producción de p24 en el punto de tiempo 24 horas fue 91 ng/ml y los títulos del sobrenadante recogido a las 24 y 48 horas fueron 5×10^4 IU/ml determinada mediante selección por puromicina. El Exp. 2 fue similar al Exp. 1, a excepción de que se permitió la acumulación del virus durante los tiempos de recogida indicados antes del análisis. En estas condiciones, la producción de p24 varió desde 954 ng/ml a las 48 horas hasta 2300 ng/ml antes de 96 horas. Estos niveles se encuentran ahora en el intervalo producido por el sistema transitorio (1-10 μg/ml) (datos no mostrados). De manera destacada, aunque los niveles de p24 aumentaron con la acumulación, los sobrenadantes de los tres puntos de tiempo tuvieron unos títulos similares ($4-6 \times 10^4$ IU/ml) en células 293T. Esto corresponde a <1% de expresión de EGFP en células 293T transducidas con los sobrenadantes acumulados a las 48 y 72 horas. Además, aunque los sobrenadantes virales generados del sistema transitorio tienen niveles de p24 comparables con el clon de PR*SAR después de la acumulación, normalmente tienen títulos de $5-10 \times 10^6$ IU/ml (Tabla 3). Este dato sugiere que la producción de p24 no es probablemente el factor limitante para conseguir títulos elevados del clon de empaquetamiento.

ES 2 307 726 T3

TABLA 2

*Producción de p24 y título de clon de PR*SAR*

Experimento	Recogida de sobrenadante	Producción de p24 (ng/ml)	Título IU/ml (selección por purimicina)	% EGFP (FACS)
Exp. 1	24 h	91	5×10^4	ND
	48 h	ND	5×10^4	ND
Exp. 2	48 h acumulativo	954	$4-6 \times 10^4$	0,90
	72 h acumulativo	1800	$4-6 \times 10^4$	0,80
	96 h acumulativo	2300	$4-6 \times 10^4$	ND

Ejemplo 7

Efecto de la expresión de la envoltura en el título del clon de células de empaquetamiento

Para determinar si una pérdida de expresión de la envoltura podría contribuir a los títulos inferiores de clon de empaquetamiento de PR*SAR, primero se realiza un análisis FACS para verificar la expresión de env de A-MLV. Se detectó un nivel equivalente de envoltura mediante FACS en comparación con la línea celular parental 293 Ea6. Para analizar adicionalmente si la envoltura era limitante, se transfectaron construcciones de expresión de envoltura en el clon de empaquetamiento de PR*SAR, que previamente se había transducido de manera estable con el vector pHLEIP. Se utilizaron ambas construcciones de expresión de env de VSV-G y A-MLV. La Tabla 3 muestra una comparación de los títulos y la eficacia de transducción del sobrenadante del clon de empaquetamiento estable en presencia o ausencia de envoltura adicional. La adición de VSV-G aumentó el título de 5 a 8 veces y permitió una eficacia de transducción detectable del 14%. La adición de env de A-MLV también aumentó el título, pero en sólo dos veces. Estos resultados indican que el título del clon de las células de empaquetamiento de PR*SAR se puede mejorar mediante el incremento de la expresión de la envoltura.

Los niveles de Gag producidos a partir del clon de empaquetamiento de PR*SAR, alcanzan los niveles obtenidos con el sistema de empaquetamiento transitorio. Sin embargo, los títulos aún son inferiores que los del sistema transitorio. Los inventores han demostrado que la envoltura es limitante en el clon que se aisló y, por tanto, el cribado de más clones basados en la expresión de la envoltura, así como la producción de p24, podría aumentar la posibilidad de obtener un clon con un mayor título. Además, el vector de transferencia se introdujo en el clon de empaquetamiento mediante sólo una ronda de transducción, limitando de este modo el número de copias del vector. El aumento de las copias del vector en la línea celular de empaquetamiento también mejoraría los títulos.

ES 2 307 726 T3

TABLA 3

*El título y la eficacia de la transducción del clon de PR*SAR mejora con una mayor expresión de la envoltura*

Sistema de empaquetamiento	Envoltura añadida	Título IU/ml (selección por purimicina)	% EGFP (FACS)
Estable	Ninguna	$4-6 \times 10^4$	< 1
	A-MLV	1×10^5	ND
	VSV-G	3×10^5	14
Transitorio	A-MLV	5×10^6	22
	VSV-G	2×10^7	91

Ejemplo 8

Construcción de construcciones de empaquetamiento para vectores lentivirales de base BIV

Para generar una construcción de empaquetamiento lentiviral de base BIV, se amplifica por PCR CTE con dos cebadores CTE1 (5'-CGGGGTACACCTCCCCTGTGAGCTAG-3') (SEC ID NO. 9) y CTE2 (TGCTCTAGAGA CACATCCCTCGGAGGC-3') (SEC ID NO. 10). El producto amplificado se digiere con KpnI y XbaI y se une a un plásmido pCI previamente digerido con KpnI y XbaI, generando pCI.CTE. A continuación, la secuencia codificante de gag y pol de BIV se amplifican por PCR con dos cebadores GAGS (5'-CCGCTCGAGATGAAGAGAAGGGAGT TAGAA-3') (SEC ID NO. 11) y POL3 (5'-CCGCTCGAGTCACGAACTCCCATCTTGGAT-3') (SEC ID NO. 12). El producto amplificado se digiere con XhoI y se une a pCI.CTE digerido previamente con XhoI, generando una construcción de empaquetamiento de base BIV, pCIBIVGP. Alternativamente, se puede sustituir CTE por RRE RRE (Elemento de respuesta a Rev) de BIV y Rev. Para crear el cambio de Treonina a Serina en proteasa de BIV (correspondiente al aminoácido número 26 desde el inicio de la pProteasa) para generar una proteasa de BIV potencialmente menos tóxica, se somete pCIBIVGP a una amplificación por PCR con cebador, el Cebador A (5'-GGGTTAGTAGACTCTGGA-3') (SEC ID NO. 13) y Cebador B (5'-GCCCGGGTCGACTCTAGA-3') (SEC ID NO. 14). El cebador B contiene la mutación de A a T, que confiere la sustitución de aminoácidos de Thr a Ser. El producto de PCR amplificado a partir de los cebadores A y B se digiere con AccI y se une a pCIBIVGP digerido previamente con AccI dando lugar a pCIBIVGPmut con la mutación deseada en la proteasa.

Ejemplo 9

Construcciones de empaquetamiento de BIV con secuencia gag/pol recodificada o secuencia gag/pol recodificada con mutación específica en proteasa

Sin estar unido a ninguna teoría, se cree que los lentivirus tales como VIH, SIV y BIV contienen secuencias de ácidos nucleicos en sus ARNs virales que provocan la inestabilidad del ARN, evitando de este modo la exportación nuclear eficaz de ARNs virales. Se cree que esto es debido al hecho de que los lentivirus emplean un uso de codón y/o una estructura secundaria de ARN que está determinada por la secuencia de ARN, extraños. Los ARNs virales que contienen estos codones raros no se pueden transportar de manera eficaz fuera del núcleo sin Rev/RRE. Se recodificó la secuencia codificante de gag/pol de BIV utilizando codones de *Homo sapiens* preferidos (Tabla 4) para eliminar el RRE de la construcción de empaquetamiento, para minimizar o eliminar los solapamientos entre las construcciones de empaquetamiento y el vector de transferencia y para aumentar los niveles de expresión de los genes gag/pol de BIV. Se seleccionó la secuencia tal como la SEC ID NO. 15 para la construcción de gag/pol recodificada. Se contrató la compañía Aptagen (Herdon, VA) para clonar esta construcción de ADN. La secuencia codificante de gag/pol recodificada se clonó en el vector de expresión de mamífero pCI, generando pCligpSyn (Figura 3). La generación de pCligpSyn permitió producir vectores de BIV a partir de un sistema de cuatro componentes mediante cotransfección de pCligpSyn, pTracerARev (una construcción de expresión de Rev de BIV que contiene SEC ID NO. 16; Tabla 7), pBIVminivec (una construcción de vector de transferencia de base BIV que codifica GFP), y pCMVSV-G (una construcción de expresión de VSV-G). Los vectores de BIV generados a partir de este sistema con gag/pol recodificada eran completamente funcionales tal como se indica por su capacidad para translucir de manera eficaz células (Tabla 5).

ES 2 307 726 T3

TABLA 4

Secuencia de gag/pol recodificada (SEC ID No. 15)

5 ATGAAGCGGAGAGAGCTGGAGAAGAACTGAGGAAAGTGCGCGTGACACCTCAACAG
GACAAGTACTATACCATCGGCAACCTGCAGTGGGCCATCCGCATGATCAACCTGATGG
10 GCATCAAGTGCGTGTGCGACGAGGAATGCAGCGCCGCTGAGGTGCGCCTGATCATCA
CCCAGTTTAGCGCCCTCGACCTGGAGAACTCCCCTATCCGCGGCAAGGAAGAGGTGG
15 CCATCAAGAATACCCTGAAGGTGTTTTGGAGCCTGCTGGCCGGATACAAGCCTGAGAG
CACCGAGACCGCCCTGGGATACTGGGAAGCCTTCACCTACAGAGAGAGGGGAAGCTAG
AGCCGACAAGGAGGGAGAGATCAAGAGCATCTACCCTAGCCTGACCCAGAACACCCAG
20 AACAAAGAAACAGACCAGCAATCAGACAAACACCCAGAGCCTGCCCCGCTATCACCACAC
AGGATGGCACCCCTCGCTTCGACCCCGACCTGATGAAGCAGCTGAAGATCTGGTCCGA
TGCCACAGAGCGCAATGGAGTGGACCTGCATGCCGTGAACATCCTGGGAGTGATCACA
GCCAACCTGGTGAAGAAGAGATCAAGTCTCTGCTGAATAGCACACCCAAGTGGCGCC
25 TGGACGTGCAGCTGATCGAGAGCAAAGTGAGAGAGAAGGAGAACGCCACCGCACCT
GGAAGCAGCATCACCTGAGGCTCCCAAGACAGACGAGATCATTGAAAGGGACTGAG
CTCCGCCGAGCAGGCTACCCTGATCAGCGTGGAGTGCAGAGAGACCTTCCGCCAGTG
30 GGTGCTGCAGGCTGCCATGGAGGTGCGCCAGGCTAAGCACGCCACACCCGACCTAT
CAACATCCATCAAGGCCCTAAGGAACCCTACACCGACTTCATCAACCGCCTGGTGGCT
GCCCTGGAAGGAATGGCCGCTCCCGAGACCACAAAGGAGTACCTCCTGCAGCACCTG
35 AGCATCGACCACGCCAACGAGGACTGTCAGTCCATCCTGCGCCCTCTGGGACCCAACA
CACCTATGGAGAAGAACTGGAGGCCTGTGCGGTGGTGGGAAGCCAGAAGAGCAAGA
TGCAGTTCCTGGTGGCCGCTATGAAGGAAATGGGGATCCAGTCTCCTATTCCAGCCGT
40 GCTGCCTCACACACCCGAAGCCTACGCC TCCCAAACCTCAGGGCCCGAGGATGGTAG
GAGATGTTACGGATGTGGGAAGACAGGACATTTGAAGAGGAATTGTAACAGCAAAAAT
GCTACCATTGTGGCAAACCTGCCACCAAGCAAGAACTGCAGGTCAAAAACGGGAA
45 GTGCTCCTCTGCCCTTATGGGCAGAGGAGCCAACCACAGAACAATTTTACCAGAGC
AACATGAGTTCTGTGACCCCATCTGCACCCCTCTTATATTAGATTAGACAAACAGCCTT
TTATAAAGGTGTTTATTGGCGGCCGCTGGGTGAAGGGACTGGTGGACACAGGCGCTG
50 ACGAGGTGGTGTGAAGAACATCCACTGGGACCGCATCAAAGGCTACCCTGGAACA
CATCAAGCAGATCGGCGTGAACGGCGTGAACGTGGCTAAGCGCAAAACACATGTGGAG
TGGAGATTCAAAGACAAGACCGGCATCATTGACGTCCTCTTCAGCGACACACCTGTGAA
55 CCTGTTTGGCAGAAGCCTGCTCAGATCCATCGTGACCTGCTTTACCCTGCTGGTGCAC
ACCGAGAAGATCGAGCCACTGCCTGTGAAGGTGCGCGGCCCTGGACCTAAGGTGCCA
CAATGGCCCTGACCAAGGAGAAATACCAGGCCCTGAAGGAGATCGTGAAGGACCTGC
60 TGGCCGAGGGAAAGATCAGCGAAGCTGCCTGGGACAACCCTTACAACACACCCGTGTT
CGTGATCAAGAAGAAAGGCACCGGCCGCTGGCGCATGCTGATGGACTTCCGCGAGCT
GAATAAGATCACCGTGAAAGGCCAAGAGTTCAGCACAGGACTCCCTTATCCACCCGGC
65 ATCAAGGAGTGTGAGCACCTGACCGCCATCGACATCAAGGACGCCTACTTCACCATCC

ES 2 307 726 T3

CTCTGCACGAGGACTTCAGACCCTTCACAGCCTTCAGCGTGGTCCCAGTGAACCGCGA
GGGCCCCATCGAGCGCTTCCAGTGGAACGTCCTGCCTCAAGGCTGGGTGTGCTCCCC
5 TGCCATCTACCAGACCACAACCCAGAAGATCATTGAGAACATCAAGAAGAGCCATCCCC
ACGTGATGCTGTATCAGTACATGGATGACCTCCTGATTGGCAGCAATCGCGATGACCA
CAAGCAGATCGTGCAGGAGATCAGAGACAAGCTGGGCAGCTATGGCTTCAAGACACCC
10 GACGAGAAAGTGCAGGAAGAGCGCGTGAAGTGGATCGGCTTCGAGCTGACACCTAAG
AAATGGAGATTCCAGCCTAGGCAACTGAAGATCAAGAACCCACTGACCGTGAACGAAC
TCCAGCAGCTGGTCCGCAACTGTGTGTGGGTGCAGCCCAGGTGAAGATCCCTCTGT
15 ACCCACTGACCGATCTGCTCCGCGACAAGACCAACCTGCAGGAAAAGATCCAGCTGAC
ACCCGAGGCCATCAAGTGCCTGGAAGAGTTCAACCTGAAGCTGAAAGATCCCGAGTGG
AAGGACAGAATTCGCGAAGGAGCCGAGCTGGTGTCAAGATCCAAATGGTCCCTCGCG
20 GCATCGTGTTTCGACCTGCTGCAAGACGGCAATCCTATCTGGGGAGGCGTGAAAGGACT
GAACTACGACCACAGCAACAAGATCAAGAAGATCCTGCGCACCATGAACGAGCTGAAC
CGCACCGTGGTGTATCATGACCGGACGCGAAGCTAGCTTTCTCCTGCCTGGATCCAGCG
25 AGGATTGGGAGGCCCGCCCTGCAGAAGGAAGAGAGCCTGACCCAAATCTTTCCCGTAA
GTTCTACCGCCATAGCTGTAGATGGACAAGCATCTGTGGACCCGTCCGCGAGAACCTG
ACCACCTACTATACCGACGGCGGGAAGAAAGGAAAGACAGCTGCCGAGTGTACTGGT
GTGAAGGAAGAACTAAGAGCAAAGTGTTCCCTGGAACCAATCAACAGGCTGAGCTGAA
30 GGCAATCTGCATGGCTCTGCTGGACGGAACCTCCCAAGATGAACATCATCACCGACAGC
CGCTACGCTTATGAGGGCATGAGAGAGGAACCTGAGACCTGGGCTCGCGAGGGCATC
TGGCTGGAGATTGCAAAGATCCTGCCATTCAAGCAATACGTCCGAGTGGGCTGGGTCC
35 CTGCTCACAAAGGCATTGGAGGCAATACCGAGGCTGACGAAGGAGTGAAGAAAGCCCT
GGAGCAAATGGCACCATGTTCCCCTCCCGAGGCTATCCTGCTCAAACCTGGCGAGAAG
CAAAACCTGGAGACCGGCATCTACATGCAAGGCTGAGACCTCAGAGCTTCCTGCCCC
40 GCGCTGACCTCCCTGTCGCAATCACTGGCACCATGGTGGACTCCGAGCTGCAGCTCCA
ACTGCTGAACATCGGCACCGAGCACATTCGCATCCAGAAGGACGAGGTGTTTATGACA
TGCTTCCTGGAGAACATCCCTAGCGCCACCGAAGACCACGAGAGATGGCACACATCCC
45 CAGACATCCTGGTCCGCCAGTTCACCTGCCCAAGCGCATCGCCAAGGAGATCGTCCG
CCGCTGCCAGGAGTGCAAGAGAACCACAACCTCCCCAGTGCGCGGCACCAACCCTAG
AGGACGCTTCCTGTGGCAGATGGACAACACACACTGGAACAAAACCATCATTTGGGTC
GCAGTGGAGACTAACAGCGGACTGGTGGAGGCTCAGGTGATTCCCGAAGAGACCGCA
50 CTGCAAGTGGCCCTGTGTATCCTCCAGCTGATCCAACGCTACACCGTCCCTGCACCTGC
ACAGCGACAACGGACCCTGCTTACAGCTCACCGCATCGAGAACCTGTGCAAGTACCT
55 GGGCATCACCAAGACAACCGGCATTCCCTACAATCCTCAGAGCCAAGGAGTCTGTGGAA
AGAGCCCATCGCGACCTGAAGGACAGACTGGCTGCCTATCAAGGCGACTGCGAGACC
GTGGAAGCTGCACTGAGCCTCGCCCTGGTCAGCCTGAACAAGAAGAGAGGAGGCATC
60 GCGGACACACACCCTACGAGATCTATCTGGAGAGCGAGCACACCAAGTATCAGGACC
AACTGGAGCAGCAATTCAGCAAGCAGAAGATCGAGAAATGGTGTACTCGTCCGCAACAG
ACGCAAGGAGTGGAAAGGGCCCTTACAAGGTGCTGTGGGATGGCGACGGAGCTGCAGT
65 GATCGAGGAAGAGGGCAAGACCGCTCTGTATCCCCACCGGCACATGCGCTTCATCCCA
CCTCCCGACAGCGATATCCAGGACGGCTCCAGCTGA

ES 2 307 726 T3

TABLA 5

Construcción de empaquetamiento	Eficacia de la transducción	Intensidad de GFP promedio
Mock	0%	0
pCligpSyn	91%	1000
pCligpSynSer	92%	1050

Comparación de la expresión de GFP mediada por el vector de BIV de células HeLa. Los vectores de BIV que codifican GFP se generaron por la construcción de empaquetamiento pCligpSyn o por la construcción de empaquetamiento pCligpSynSer. Se compararon por su eficacia en la transducción de células HeLa y la intensidad de la expresión de GFP. La eficacia de transducción se midió como el porcentaje de células HeLa positivas. La intensidad de GFP promedio se valoró mediante la intensidad de fluorescencia relativa. Tanto la eficacia de la transducción como la intensidad de GFP promedio se analizaron mediante citometría de flujo en un FACS Calibur (Becton Dickinson Biosciences).

En la presente solicitud se ha propuesto que una mutación en la región codificante de la proteasa de BIV reduce la toxicidad de la proteasa de BIV en las células. De manera específica, se realiza una mutación puntual en la construcción de empaquetamiento pCligpSyn en el aminoácido Thr codificado por los nucleótidos ACT (correspondiente a los nucleótidos 1806 a 1808 en el extracto 127 de ARN genómico viral de BIV, Garvey *et al.*, 1990). Dicha Thr se sustituirá por Ser en la misma posición sin ningún otro cambio en la región codificante de la construcción de empaquetamiento. Esta construcción de empaquetamiento con una mutación de Thr a Ser se designó como pCligpSynSer. Se comparó pCligpSynSer con pCligpSyn en la capacidad para soportar la producción de vectores de BIV y la eficacia de transducción conseguida por los vectores de BIV. Específicamente, se transfectaron 8×10^6 células 293T en placas de 10 cm con pCligpSyn o pCligpSynSer (1 μ g), pTracerARev (10 μ g), pBIVminivec (15 μ g), y pCMWSV-G (4,5 μ g). Cuarenta y ocho horas después de la transfección, se recogieron los vectores de las células transfectadas. Las células HeLa se transdujeron con cantidades iguales de partículas de vector tal como se indica por la actividad de transcriptasa inversa (RT). Cuarenta y ocho horas después de la transducción, se realizó un análisis por citometría de flujo para valorar las células HeLa positivas en GFP. Tal como se indica en la Tabla 5, el vector generado por la construcción de empaquetamiento con la mutación de Thr a Ser, pCligpSynSer, transdujo las células HeLa de forma tan eficaz como el vector producido por la construcción de empaquetamiento pCligpSyn. La secuencia de nucleótidos para este gen gag/pol mutado se muestra en la Tabla 6 (SEC ID NO. 17).

ES 2 307 726 T3

TABLA 6

Secuencia de gag/pol recodificada con mutación en proteasa (SEC ID No. 17)

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

ATGAAGCGGAGAGAGCTGGAGAAGAACTGAGGAAAGTGCGCGTGACACCTCAACAG
GACAAGTACTATACCATCGGCAACCTGCAGTGGGCCATCOGCATGATCAACCTGATGG
GCATCAAGTGCGTGTGCGACGAGGAATGCAGCGCCGCTGAGGTCGCCCTGATCATCA
CCCAGTTTAGCGCCCTCGACCTGGAGAACTCCCCTATCCGCGGCAAGGAAGAGGTGG
CCATCAAGAATACCCTGAAGGTGTTTTGGAGCCTGCTGGCCGGATACAAGCCTGAGAG
CACCGAGACCGCCCTGGGATACTGGGAAGCCTTCACCTACAGAGAGAGGGAAGCTAG
AGCCGACAAGGAGGGAGAGATCAAGAGCATCTACCCTAGCCTGACCCAGAACACCCAG
AACAGAAACAGACCAGCAATCAGACAAACACCCAGAGCCTGCCCGCTATACCAACAC
AGGATGGCACCCCTCGCTTCGACCCCGACCTGATGAAGCAGCTGAAGATCTGGTCCGA
TGCCACAGAGCGCAATGGAGTGGACCTGCATGCCGTGAACATCCTGGGAGTGATCACA
GCCAACCTGGTGCAGAAGAGATCAAGCTCCTGCTGAATAGCACACCCAAGTGGCGCC
TGGACGTGCAGCTGATCGAGAGCAAAGTGAGAGAGAAGGAGAACGCCACCCGCACCT
GGAAGCAGCATCACCTGAGGCTCCCAAGACAGACGAGATCATTGGAAAGGGACTGAG
CTCCGCCGAGCAGGCTACCCTGATCAGCGTGGAGTGCAGAGAGACCTTCCGCCAGTG
GGTGTGTCAGGCTGCCATGGAGTCCGCCAGGCTAAGCACGCCACACCCGGACCTAT
CAACATCCATCAAGGCCCTAAGGAACCCTACACCGACTTCATCAACCGCCTGGTGGCT
GCCCTGGAAGGAATGGCCGCTCCCGAGACCACAAAGGAGTACCTCCTGCAGCACCTG
AGCATCGACCACGCCAACGAGGACTGTCAGTCCATCCTGCGCCCTCTGGGACCCAACA
CACCTATGGAGAAGAACTGGAGGCCTGTGCGTGGTGGGAAGCCAGAAGAGCAAGA
TGCAGTTCCTGGTGGCCGCTATGAAGGAAATGGGGATCCAGTCTCCTATTCCAGCCGT
GCTGCCTCACACACCCGAA GCCTACGCC TCCCAAACCTCAGGGCCCGAGGATGGTAG
GAGATGTTACGGATGTGGGAAGACAGGACATTTGAAGAGGAATTGTAACAGCAAAAAT
GCTACCATTGTGGCAAACCTGCCACCAAGCAAGAACTGCAGGTCAAAAACGGGAA

ES 2 307 726 T3

GTGCTCCTCTGCCCTTATGGGCAGAGGAGCCAACCACAGAACAATTTTCACCAGAGC
AACATGAGTTCTGTGACCCCATCTGCACCCCTCTTATATTAGATTAGACAAACAGCCTT
5 TTATAAAGGTGTTTCATTGGCGGCCGCTGGGTGAAGGGACTGGTGGACTCAGGCGCTG
ACGAGGTGGTGTGAAGAACATCCACTGGGACCGCATCAAAGGCTACCCTGGAACACC
CATCAAGCAGATCGGCGTGAACGGCGTGAACGTGGCTAAGCGCAAACACATGTGGAG
10 TGGAGATTCAAAGACAAGACCGGCATCATTGACGTCCTCTTCAGCGACACACCTGTGAA
CCTGTTTGGCAGAAGCCTGCTCAGATCCATCGTGACCTGCTTTACCCTGCTGGTGCAC
ACCGAGAAGATCGAGCCACTGCCTGTGAAGGTGCGCGGCCCTGGACCTAAGGTGCCA
CAATGGCCCCTGACCAAGGAGAAATACCAGGCCCTGAAGGAGATCGTGAAGGACCTGC
15 TGGCCGAGGGAAAGATCAGCGAAGCTGCCTGGGACAACCCTTACAACACACCCGTGTT
CGTGATCAAGAAGAAAGGCACCGGCCGCTGGCGCATGCTGATGGACTTCCGCGAGCT
GAATAAGATCACCGTGAAAGGCCAAGAGTTCAGCACAGGACTCCCTTATCCACCCGGC
20 ATCAAGGAGTGTGAGCACCTGACCGCCATCGACATCAAGGACGCCTACTTCACCATCC
CTCTGCACGAGGACTTCAGACCCTTCACAGCCTTCAGCGTGGTCCCAGTGAACCGCGA
GGGCCCATCGAGCGCTTCCAGTGAACGTCCTGCCTCAAGGCTGGGTGTGCTCCCC
25 TGCCATCTACCAGACCACAACCCAGAAGATCATTGAGAACATCAAGAAGAGCCATCCCG
ACGTGATGCTGTATCAGTACATGGATGACCTCCTGATTGGCAGCAATCGCGATGACCA
CAAGCAGATCGTGCAGGAGATCAGAGACAAGCTGGGCAGCTATGGCTTCAAGACACCC
30 GACGAGAAAGTGCAGGAAGAGCGCGTGAAGTGGATCGGCTTCGAGCTGACACCTAAG
AAATGGAGATTCCAGCCTAGGCAACTGAAGATCAAGAACCCACTGACCGTGAACGAAC
TCCAGCAGCTGGTCCGCAACTGTGTGTGGGTGCAGCCCGAGGTGAAGATCCCTCTGT
35 ACCCACTGACCGATCTGCTCCGCGACAAGACCAACCTGCAGGAAAAGATCCAGCTGAC
ACCCGAGGCCATCAAGTGCGTGGAAAGAGTTCAACCTGAAGCTGAAAGATCCCGAGTGG
AAGGACAGAATTCGCGAAGGAGCCGAGCTGGTGATCAAGATCCAAATGGTCCCTCGCG
40 GCATCGTGTTTCGACCTGCTGCAAGACGGCAATCCTATCTGGGGAGGCGTGAAAGGACT
GAACTACGACCACAGCAACAAGATCAAGAAGATCCTGCGCACCATGAACGAGCTGAAC
CGCACCGTGGTGATCATGACCGGACGCGAAGCTAGCTTTCTCCTGCCTGGATCCAGCG
45 AGGATTGGGAGGCCGCCCTGCAGAAGGAAGAGAGCCTGACCCAAATCTTCCCGTGAA
GTTCTACCGCCATAGCTGTAGATGACAAGCATCTGTGGACCCGTCCGCGAGAACCTG
ACCACCTACTATACCGACGGCGGGAAGAAAGGAAAGACAGCTGCCGAGTGTACTGGT
50 GTGAAGGAAGAATAAGAGCAAAGTGTCCCTGGAACCAATCAACAGGCTGAGCTGAA
GGCAATCTGCATGGCTCTGCTGGACGGACCTCCCAAGATGAACATCATACCGACAGC
CGCTACGCTTATGAGGGCATGAGAGAGGAACCTGAGACCTGGGCTCGCGAGGGGCATC

55

60

65

ES 2 307 726 T3

5 TGGCTGGAGATTGCAAAGATCCTGCCATTCAAGCAATACGTCGGAGTGGGCTGGGTCC
CTGCTCACAAAGGCATTGGAGGCAATACCGAGGCTGACGAAGGAGTGAAGAAAGCCCT
GGAGCAAATGGCACCATGTTCCCCTCCCAGGCTATCCTGCTCAAACCTGGCGAGAAG
CAAACCTGGAGACCGGCATCTACATGCAAGGCCTGAGACCTCAGAGCTTCCTGCCCC
10 GCGCTGACCTCCCTGTCGCAATCACTGGCACCATGGTGGACTCCGAGCTGCAGCTCCA
ACTGCTGAACATCGGCACCGAGCACATTCGCATCCAGAAGGACGAGGTGTTTCATGACA
TGCTTCCTGGAGAACATCCCTAGCGCCACCGAAGACCACGAGAGATGGCACACATCCC
CAGACATCCTGGTCCGCCAGTTCACCTGCCAAGCGCATCGCCAAGGAGATCGTCGC
15 CCGCTGCCAGGAGTGCAAGAGAACCACAACCTCCCCAGTGCGCGGCACCAACCCTAG
AGGACGCTTCCTGTGGCAGATGGACAACACACACTGGAACAAAACCATCATTTGGGTC
GCAGTGGAGACTAACAGCGGACTGGTGGAGGCTCAGGTGATTCCCGAAGAGACCGCA
20 CTGCAAGTGGCCCTGTGTATCCTCCAGCTGATCCAACGCTACACCGTCCCTGCACCTGC
ACAGCGACAACGGACCCTGCTTCACAGCTCACCGCATCGAGAACCTGTGCAAGTACCT
GGGCATCACCAAGACAACCGGCATTCCCTACAATCCTCAGAGCCAAGGAGTCGTGGAA
AGAGCCCATCGCGACCTGAAGGACAGACTGGCTGCCTATCAAGGCGACTGCGAGACC
25 GTGGAAGCTGCACTGAGCCTCGCCCTGGTCAGCCTGAACAAGAAGAGAGGAGGCATC
GGCGGACACACACCCTACGAGATCTATCTGGAGAGCGAGCACACCAAGTATCAGGACC
AACTGGAGCAGCAATTCAGCAAGCAGAAGATCGAGAAATGGTGCTACGTCCGCAACAG
30 ACGCAAGGAGTGAAGGGCCCTTACAAGGTGCTGTGGGATGGCGACGGAGCTGCAGT
GATCGAGGAAGAGGGCAAGACCGCTCTGTATCCCCACCGGCACATGCGCTTCATCCCA
CCTCCCGACAGCGATATCCAGGACGGCTCCAGCTGA

40

TABLA 7

Secuencia del gen Rev (SEC ID No. 16)

45

ATGGATCAGGACCTAGACCGCGCGGAACGCGGGGAAAGGGGAGGAGGATCCGA
AGAACTGCTTCAGGAGGAGATCAACGAAGGGAGGCTGACAGCCAGAGAAGCTTTACAA
ACATGGATCAATAACGATTCTCCTAGGTATGTTAAGAAGCTGCGCCAAGGTCAGCCAGA
ATTACCAACATCTCCCGCGGAGGAGGAGGACGGGGACACAGAGCCAGAAAGCTCCC
50 CGGCGAGAGGAGACCCGGCTTCTGGAAGTCTCTACGAGAATTGGTTGAACAAAATAGG

55

AGAAAGCAAGAACGACGCCTATCGGGTCTGGACAGAAGAATACAACAGCTTGAGGATC
TTGTTCCGCACATGTCGCTGGGATCTCCTGACCCCTCAACTCCTTCAGCTTCCGTTCTT
TCTGTAAACCCTCCTGCTCAAACCTCTTGGGACATCTTCCGCCACGCTCCTATTTTAA
CTTAAAAGGGTGGACTGTGGGGCAGGGTGGGACCTCAGGACAACAGCAGCCCCCGGA
60 CTTCCCATATGTGAATTGGACTGGATCCAGGGAACAAAATAA

65

Ejemplo 10

Procedimiento para la generación de líneas celulares productoras para vectores lentivirales de base BIV

5 La construcción de empaquetamiento lentiviral de base BIV pCIBIVGpmut se transfecta en células 293Ea6 (una línea celular que expresa la envoltura de A-MLV tal como se describe en la presente invención en el ejemplo 3) junto con un plásmido que codifica el marcador seleccionable puromicina tal como se describe en la presente invención para la construcción de empaquetamiento lentiviral de base VIH. Las células transfectadas se cultivan en un medio que contiene puromicina tal como se describe en la presente invención en el ejemplo 3. Los clones de células individuales
 10 resistentes a puromicina se controlan en la producción de Gag/Pol de BIV en el medio de cultivo celular mediante el ensayo específico de la actividad de Transcriptasa Inversa (TR) de BIV. El ensayo de RT se realiza con un kit para ensayo de RT adquirido de Roche (Producto No. 1828657) aprovechando el hecho de que la RT de BIV reacciona de forma cruzada con la RT de VIH. El clon de células individuales que expresa la RT más elevada se controla en su estabilidad en la producción de Gag/Pol de BIV. Alternativamente, se utilizan otras líneas celulares de mamífero
 15 en lugar de la línea celular 293. Alternativamente, se utiliza una línea celular que expresa de manera constitutiva otra envoltura viral en lugar de la envoltura de A-MLV. Se introduce un vector de transferencia de base BIV en el clon celular con la producción estable más elevada de RT de BIV mediante la transfección con un vector plásmido de transferencia de base BIV o la infección con partículas de vector lentiviral de base BIV. Los sobrenadantes resultantes de la línea celular de empaquetamiento se recogen a varios tiempos.
 20

Ejemplo 11

Otro procedimiento para la generación de líneas celulares productoras para vectores lentivirales de base BIV

25 Para generar una línea celular productora para la producción de vectores lentivirales de base BIV, se cotransfecta una construcción que codifica Gag/Pol de BIV recodificada con la mutación de proteasa con un plásmido que codifica el marcador seleccionable higromicina en células 293. Los clones resistentes a higromicina se seleccionan y se criban por la expresión de Gag/Pol de BIV mediante el ensayo de actividad de transcriptasa inversa (RT). Los clones positivos que expresan Gag/Pol de BIV se expanden para el análisis funcional mediante la cotransfección con la construcción de expresión Rev de BIV (pTracerARev), construcción de expresión de VSV-G y construcción de vector de transferencia de BIV que codifica GFP. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, se recoge el sobrenadante de las células transfectadas y se utiliza para transducir las células 293 sin tratar. Los clones que producen las cantidades más elevadas de vectores de BIV funcionales indicadas mediante el porcentaje de células positivas de GFP se guardan para su uso
 30 posterior. En los clones identificados de células funcionales que expresan Gag/Pol de BIV, se introduce mediante transfección una segunda construcción que codifica Rev de BIV con un marcador seleccionable tal como puromicina (pEF1aReviRESPuro). Se seleccionan los clones resistentes a puromicina. A continuación, se criban los clones por la expresión de Gag/Pol y Rev funcionales de BIV mediante la cotransfección con una construcción de expresión de VSV-G y una construcción de vector de transferencia de BIV que codifica GFP. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, se recoge el sobrenadante de las células transfectadas y se utiliza para transducir las células 293 sin tratar. Los clones que producen las cantidades más elevadas de vectores de BIV funcionales indicadas mediante el porcentaje de células positivas de GFP se guardan para su uso posterior. En los clones de células funcionales que expresan Gag/Pol de BIV y Rev de BIV, se introduce mediante transfección una tercera construcción que codifica la glicoproteína de LCMV mutante (Beyer *et al.*, J. Virol. 76: 1488-1495) con un marcador seleccionable tal como neomicina (pCILC-MVgpiRESNeo). Se seleccionan los clones resistentes a neomicina (G418). A continuación, se criban los clones por la expresión de Gag/Pol de BIV, Rev de BIV y la glicoproteína de LCMV mutante funcionales
 45 mediante la transfección con una construcción de vector de transferencia de BIV que codifica GFP. Los clones que producen las cantidades más elevadas de vectores de BIV funcionales indicadas mediante el porcentaje de células positivas de GFP se guardan para su uso posterior. Los clones identificados que expresan simultáneamente Gag/Pol de BIV, Rev de BIV y la glicoproteína de LCMV mutante funcionales sirven como línea celular de empaquetamiento. Para generar una línea celular productora para la producción determinada de un vector de base BIV, se introduce un vector de transferencia de base BIV que codifica un transgén deseado (gen marcador o gen terapéutico) en la línea celular de empaquetamiento a través de la transfección con un vector plásmido de transferencia de base BIV o la infección con una partícula de vector lentiviral de base BIV. El sobrenadante obtenido de la línea celular de empaquetamiento
 50 contiene el vector lentiviral de base BIV deseado.
 55

Referencias citadas en la descripción

60 Esta lista de referencias citadas por el solicitante se muestra únicamente para conveniencia del lector. No forma parte del documento de Patente Europea. Aunque se ha tenido una gran precaución a la hora de recopilar las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la Oficina Europea de Patentes declina cualquier responsabilidad al respecto.
 65

ES 2 307 726 T3

Documentos de patente citados en la descripción

- WO 9839463 A [0008]
- 5 • US 6277633 B [0033]
- US 5380830 A [0038]
- WO 0144458 A [0038]
- 10 • US 4683195 A [0040]
- US 4683202 A [0040]
- 15 • WO 9619573 A [0043]
- WO 9214829 A [0048]
- WO 9411524 A [0048]
- 20 • US 6004798 A [0048]
- WO 0130843 A [0050]
- 25 • WO 0206463 A [0050]

Documentos que no son patentes citados en la descripción

- **MOCHIZUKI** *et al. J. Virol.*, 1998, vol. 72 (11), 8873-8883 [0005]
- 30 • **ROSÉ** *et al. J. Virol.*, 1995, vol. 69 (5), 2751-2758 [0006]
- **KONVALINKA** *et al. J. Virol.*, 1995, vol. 69 (11), 7180-7186 [0007]
- 35 • **BERKOWITZ** *et al. J. Virol.*, 1998, vol. 75 (7), 3371-3382 [0009]
- **NAIDINI** *et al. Science*, 1996, vol. 272, 263-267 [0010]
- 40 • **KAFRL** *et al. Journal of Virology*, 1999, vol. 73, 576-584 [0010]
- Molecular Cloning, A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1989 [0018]
- **CELLS** J. E. Call Biology, A Laboratory Handbook. *Academic Press, Inc*, 1994 [0018]
- 45 • **BAHNSON** *et al. J. of Virol. Methods*, 1995, vol. 54, 131-143 [0018]
- **KONVALINKA, J.** *et al. J. Virol.*, 1995, vol. 69, 7180-7186 [0021] [0026] [0032] [0032]
- 50 • **KORBER B; THEILER J; WOLINSKY S.** *Science*, 19 June 1998, vol. 280 (5371), 1868-71 [0021]
- **ZUFFEREY** *et al. Nature Biotechnology*, 1997, vol. 15, 871-875 [0026]
- **ROGEL, M. E.** *et al. J. Virol.*, 1995, vol. 69, 882-888 [0026]
- 55 • **KLEHR, D** *et al. Biochemistry*, 1991, vol. 30, 1264-1270 [0027]
- **GARVEY** *et al. Virology*, 1990, vol. 175, 391-409 [0038]
- 60 • **COCKERILL, P.N.; GARRARD, W.T.** *Cell*, 1986, vol. 44, 273-282 [0043]
- **GASSER, S.M.; LAEMMLI, U.K.** *Cell*, 1986, vol. 46, 521-530 [0043]
- **PHI-VAN, L.** *et al. Mol. Cell Biol.*, 1990, vol. 10, 2302-2307 [0043]
- 65 • **MCKNIGHT, R.A.** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 6943-6947 [0043]
- **LICHTENSTEIN, M.** *et al. Cell*, 1994, vol. 76, 913-923 [0043]

ES 2 307 726 T3

- **KIRILLOV**, A. *et al. Nat. Genet.*, 1996, vol. 13, 435-441 [0043]
- **EMERY** *et al. PNAS*, 2000, vol. 97 (16), 9150-9155 [0045]
- 5 • **GOSSSEN; BUJARD**. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1992, vol. 89, 5547-5551 [0050]
- **BEYER** *et al. J. Virol.*, vol. 76, 1488-1495 [0051] [0069]
- **JANG**, S. K.; **M. V. DAVIES**; **R. J. KAUFMAN**; **E. WIMMER**. *J. Virol.*, 1989, vol. 63, 1651-1660 [0057]
- 10 • **VARA**, J. A.; **A. PORTELA**; **J. ORTIN**; **A. JIMENEZ**. *Nuc. Acids Res.*, 1986, vol. 14, 4617-4624 [0057]
- **SUTTON**, R. E.; **H. T. M. WU**; **R. RIGG**; **E. BOHNLEIN**; **P. O. BROWN**. *Journal of Virology*, 1998, vol. 72, 5781-5788 [0057]
- 15 • **BUMS**, J. C.; **T. FRIEDMANN**; **W. DRIEVER**; **M. BURRASCANO**; **J.-K. YEE**. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 1993, vol. 90, 8033-8037 [0057]
- **J. K.**, **A. MIYANOHARA**; **P. LAPORTE**; **K. BOUIC**; **J. C. BURNS**; **T. FRIEDMANN**. *Proceedings of the*
20 *National Academy of Sciences USA.*, 1994, vol. 91, 9564-9568 [0057]
- **RIGG**, R. J.; **J. CHEN**; **J. S. DANDO**; **S. P. FORESTELL**; **I. PLAVEC**; **E. BOHNLEIN**. *Virology*, 1996, vol. 218, 290-295 [0057]
- 25 • **BAHNSON**, A. B.; **J. T. DUNIGAN**; **B. E. BAYSAL**; **T. MOHNEY**; **R. W. ATCHISON**; **M. T. NIMGAONKAR**; **E. D. BALL**; **J. A. BARRANGER**. *J Virol Meth.*, 1995, vol. 54, 131-143 [0058]
- **RIGG**, R. J.; **J. CHEN**; **J. S. DANDO**; **S. P. FORESTELL**; **I. PLAVEC**; **E. BOHNLEIN**. *Virology*, 1996, vol. 218, 290-295 [0059]
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Construcción de empaquetamiento lentiviral que comprende una parte del gen pol lentiviral que incluye la secuencia codificante de proteasa y una eliminación en la señal de empaquetamiento lentiviral, en la que dicha secuencia codificante de proteasa incluye una mutación que da lugar a una sustitución de Thr a Ser en la proteasa lentiviral codificada, siendo dicha sustitución de Thr a Ser del residuo Thr en el motivo Asp-Thr-Gly correspondiente al aminoácido número 26 de la SEC ID No. 1.
- 10 2. Construcción de empaquetamiento según la reivindicación 1, que comprende además una parte del gen gag lentiviral.
3. Construcción de empaquetamiento según la reivindicación 1, que deriva del genoma del virus de inmunodeficiencia humano (VIH).
- 15 4. Construcción de empaquetamiento según la reivindicación 1, en la que la proteasa es una proteasa de VIH.
5. Construcción de empaquetamiento según la reivindicación 3, que comprende además una mutación en un gen vif o vpr de VIH.
- 20 6. Construcción de empaquetamiento según la reivindicación 1, que deriva del genoma del virus de inmunodeficiencia bovino (BIV).
7. Construcción de empaquetamiento según la reivindicación 1, en la que la proteasa es una proteasa de BIV.
- 25 8. Construcción de empaquetamiento según la reivindicación 6, que comprende además una mutación en un gen vif, W, Y o Tat de BIV.
9. Construcción de empaquetamiento según la reivindicación 1, que comprende además un elemento de la región de unión en andamio (SAR).
- 30 10. Construcción de empaquetamiento según la reivindicación 9, en la que el elemento SAR es un elemento IFN-SAR.
- 35 11. Construcción de empaquetamiento según la reivindicación 10, en la que el elemento IFN-SAR es un elemento β -IFN SAR.
12. Línea celular de preempaquetamiento que comprende la construcción de empaquetamiento según la reivindicación 1.
- 40 13. Línea celular de preempaquetamiento según la reivindicación 12, **caracterizada** además porque es capaz de expresar por lo menos 5 ng/ml de p24 de VIH o de proteína RT de BIV.
- 45 14. Línea celular de preempaquetamiento según la reivindicación 12, en la que la expresión de la proteína pol lentiviral es constitutiva.
15. Línea celular de empaquetamiento que comprende la construcción de empaquetamiento según la reivindicación 1 y que comprende además una construcción que comprende un gen env.
- 50 16. Línea celular de empaquetamiento según la reivindicación 15, en la que el gen env es el gen env de VSV-G.
17. Línea celular de empaquetamiento según la reivindicación 15, en la que el gen env es el gen env de LCMV mutante.
- 55 18. Línea celular productora que comprende la construcción de empaquetamiento según la reivindicación 1, un gen env y que comprende además un vector lentiviral.
19. Línea celular productora según la reivindicación 18, **caracterizada** además porque es capaz de producir un título de virus lentiviral o por lo menos $10E5$ cfu/ml.
- 60 20. Partícula de vector lentiviral obtenible a partir de la línea celular productora según la reivindicación 18, en la que dicha partícula de vector comprende un gen no lentiviral.
- 65 21. Procedimiento para la producción de un preparado de partículas de vector lentiviral que comprende las etapas de transfección de la línea celular de empaquetamiento estable según la reivindicación 15 con un vector lentiviral, la propagación de la línea celular obtenida en un medio de cultivo adecuado y la obtención de un preparado de partículas de vector lentiviral a partir de dicho medio de cultivo.

FIGURA 1

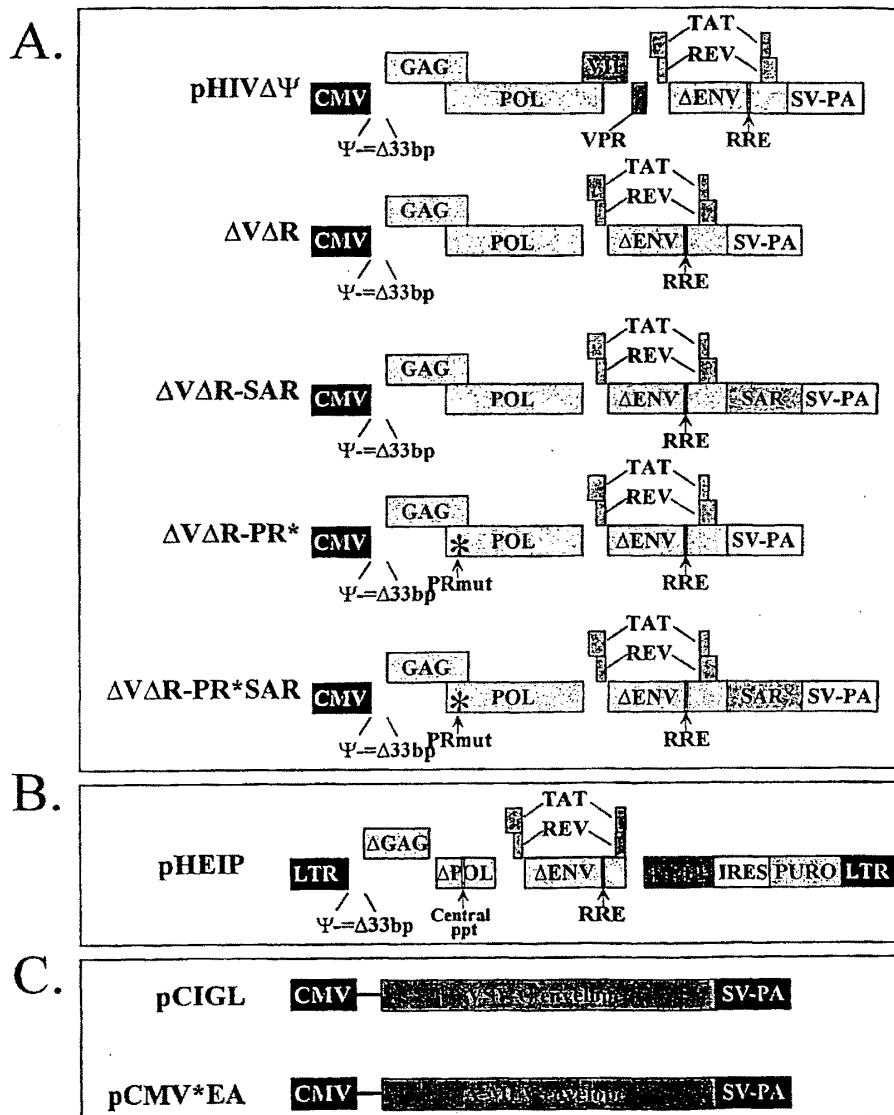


FIGURA 2

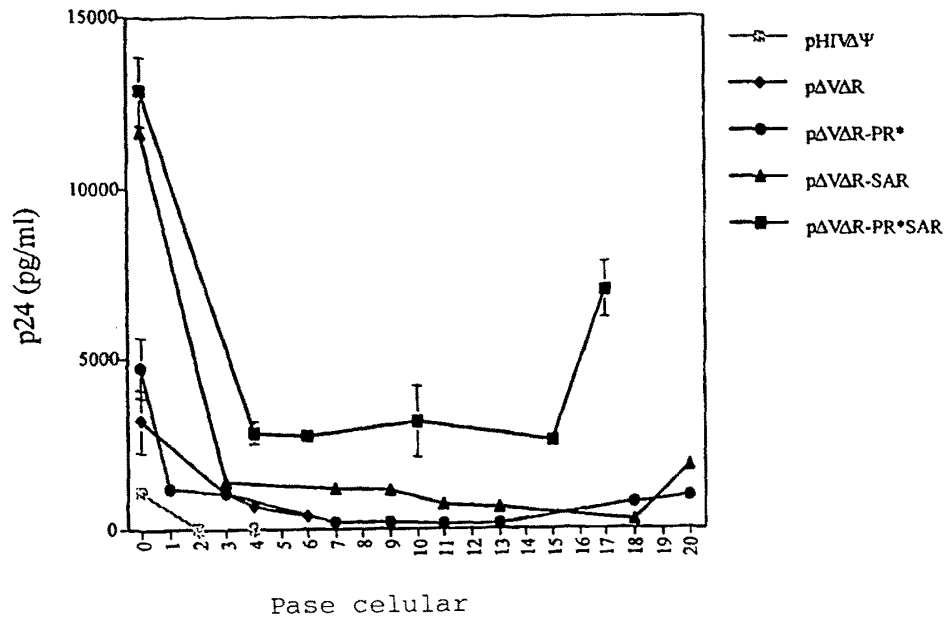


FIGURA 3

Construcción de expresión de Gag/Pol de BIV recodificada

gag/pol recodificada

