



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 326 217**

51 Int. Cl.:

C12N 15/86 (2006.01)

C07K 14/15 (2006.01)

C12N 5/06 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03747185 .1**

96 Fecha de presentación : **25.04.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1499736**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.01.2005**

54 Título: **Glicoproteínas quiméricas mejoradas y vectores lentivirales pseudotipados.**

30 Prioridad: **26.04.2002 US 375654 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
05.10.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
05.10.2009

73 Titular/es: **INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET
DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM)
101, rue de Tolbiac
75654 Paris Cédex 13, FR
INSTITUT CLAYTON DE LA RECHERCHE**

72 Inventor/es: **Trono, Didier;
Cosset, Francios-Loic;
Sandrin, Virginie;
Boson, Bertrand;
Negre, Didier y
Salmon, Patrick**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

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

Glicoproteínas quiméricas mejoradas y vectores lentivirales pseudotipados.

5 1. Campo de la invención

La presente invención se relaciona con glicoproteínas quiméricas y con vectores lentivirales mejorados pseudotipados con aquellas glicoproteínas, con métodos y composiciones para elaborar tales glicoproteínas y vectores y con métodos de transducción *in vitro* e *in vivo* de células con tales vectores. Las composiciones y los vectores mejorados son de particular utilidad para aplicaciones de transferencia génica *in vivo*.

2. Descripción del estado del arte relacionado

Los vectores derivados de retrovirus ofrecen propiedades particularmente flexibles en aplicaciones de transferencia génica dadas las numerosas asociaciones posibles de diferentes glicoproteínas de fuente viral (que determinan el tropismo celular) con diferentes tipos de núcleos virales (que determinan la replicación y la integración del genoma)¹. Por ejemplo, la asociación de la glicoproteína VSV-G con núcleos virales derivados de lentivirus resulta en pseudotipos de vectores que tienen amplio tropismo y pueden integrarse dentro de células objetivo que proliferan². Ellos han probado ser útiles para la transducción de diferentes tipos de células *ex vivo* e *in vivo*³⁻⁷. Aún existe un considerable interés en explorar las propiedades de los vectores lentivirales pseudotipados con glicoproteínas virales alternativas⁸⁻¹⁵. Este parámetro es probablemente el que modula las propiedades fisicoquímicas de los vectores, su interacción con el sistema inmune del huésped y su rango como hospedadores. Varios estudios han mostrado en realidad que la eficiencia en las transducción de las células objetivo depende del tipo de glicoproteína utilizada para recubrir vectores retrovirales¹⁶⁻²¹. Adicionalmente, algunas aplicaciones de transferencia de genes *in vivo* requerirán de vectores que estén dirigidos para entrar específicamente a la célula y/o para expresión génica después de administración sistémica²². Debido a la amplia distribución de su receptor, un componente lipídico de la membrana plasmática²³, pseudotipos VSV-G pueden enlazarse a la superficie de todas las células encontradas después de la inoculación antes de alcanzar a las células objetivo. Además, los vectores pseudotipados de VSV-G son rápidamente inactivados por el suero humano²⁴ y esto podría imponer una limitación sobre el uso de VSV-G como una glicoproteína para vectores pseudotipo para suministro sistémico génico.

Se han generado en varios laboratorios¹ vectores lentivirales derivados del virus de inmunodeficiencia simia (SIV), incluidos los nuestros²⁵. La caracterización de estos vectores ha indicado que son similares a aquellos derivados del virus de inmunodeficiencia humana (VIH-1) con respecto a la inserción de transgenes en células no proliferativas, aunque los vectores del SIV se comportan mejor que los vectores del VIH-1 en células simias²⁵.

Salmon y colaboradores (Journal of Gene Medicine, 2000) describe una glicoproteína quimérica que incluye una cola citoplasmática derivada del Virus de Leucemia de Múrido (MLV-A), y un dominio transmembrana y extracelular derivado del Virus de Leucemia del Mono Gibón (GALV). La quimera pseudotipo exitosamente a las partículas de VIH y permitió una transferencia génica eficiente.

Resumen de la invención

La presente invención está dirigida a glicoproteínas quiméricas y mutantes para uso en la elaboración de partículas de vectores virales pseudotipados. En modalidades particulares, la glicoproteína quimérica incluye un dominio de una cola citoplasmática derivado del MLV-A y un dominio transmembrana y extracelular derivado del virus endógeno de felino RD114.

En modalidades adicionales, las glicoproteínas incorporan modificaciones mínimas que permiten la formación eficiente de un pseudotipo con vectores con base en lentivirus. Modalidades específicas incluyen glicoproteínas que comprenden sitios de escisión dentro del dominio de la cola citoplasmática compatibles con la proteasa del núcleo retroviral del vector retroviral que va a ser pseudotipado con la glicoproteína alterada. En modalidades particulares, se introducen modificaciones en un tramo de 8 aminoácidos, que abarcan a un sustrato para la proteasa del núcleo viral y cuya escisión es crítica para la fusogenicidad de la glicoproteína viral. Estas modificaciones permiten el pseudotipo ya sea con un oncoretroviral o con diferentes núcleos lentivirales.

Junto con estas modalidades, una modalidad adicional de la invención es un método para hacer coincidir la secuencia de aminoácidos de la cola citoplasmática de glicoproteínas quiméricas y mutantes con las proteasas de núcleos retrovirales, lo cual resulta en un montaje dramáticamente mejorado de la glicoproteína sobre esos núcleos.

La invención también abarca construcciones de ácido nucleico que codifican a tales glicoproteínas. En una modalidad preferida, el ácido nucleico incluye a la secuencia de la SEQ ID NO: 1. En un aspecto adicional, la construcción es una construcción de expresión adecuada para la expresión de glicoproteínas tales como aquellas que están incorporadas en partículas de vectores virales recombinantes. En un aspecto adicional, la invención incluye una célula transfectada con tales construcciones de ácido nucleico.

Una modalidad de la invención incluye una partícula de un vector que comprende una glicoproteína quimérica en donde la glicoproteína quimérica comprende un dominio de una cola citoplasmática derivado del MLV-A y un dominio

transmembrana y extracelular derivado del virus endógeno de felino RD114. En un aspecto adicional, la partícula del vector es una partícula pseudotipada del vector. En un aspecto adicional, la partícula del vector comprende además una construcción del vector viral recombinante.

- 5 En otra modalidad, la partícula del vector incluye una construcción del vector en donde la construcción del vector se deriva de un retrovirus o de un lentivirus. En un aspecto, la construcción del vector se deriva de SIV o de VIH.

En otra modalidad la partícula del vector incluye a una construcción del vector, que comprende además, que incluye además a un transgén. En un aspecto, el transgén es un marcador o un gen reportero. En una modalidad particular, el transgén es una proteína fluorescente verde (GFP). En otro aspecto, el transgén es un gen terapéutico. En modalidades particulares, el transgén es un oncogén o un protooncogén. En otra modalidad particular, el transgén es un gen de susceptibilidad a un fármaco.

15 Una modalidad adicional de la presente invención es un método para transducir células que comprende:

- a) obtener células que van a ser transducidas;
- b) obtener una partícula pseudotipada del vector de acuerdo con la reivindicación 8; y
- 20 c) poner en contacto a las células con la partícula del vector de (b) bajo condiciones suficientes que conduzcan a la transducción. En una modalidad adicional, el método comprende además la etapa de proporcional retro-nectina en una cantidad suficiente para mejorar la transducción. En un aspecto del método, se transducen las células *in vitro*. En otro aspecto, se transducen las células *in vivo*. En modalidades adicionales, las células son células de vertebrados, células de primate, o células humanas. Se contempla también que las células sean células CD34+ o células PBL. Otra modalidad del método abarca a una célula transducida por medio del método.

Aún otra modalidad es un método para producir una partícula del vector viral pseudotipada recombinante que comprende:

- 30 (a) transfectar una célula con:
 - (i) al menos una construcción de un vector;
 - 35 (ii) al menos una construcción de empaquetamiento; y
 - (iii) una construcción de expresión que codifica a una glicoproteína quimérica de la reivindicación 1 para producir una célula productora;
- 40 (b) cultivar la célula productora en un medio; y
- (c) separar la célula productora del medio para recuperar la partícula del vector viral recombinante del medio.

Otra modalidad incluye poner en contacto a la célula con una partícula del vector elaborada de acuerdo con los métodos de la invención y bajo condiciones para efectuar la transducción de la célula por medio del vector recombinante. Se contempla que la célula sea específicamente una célula humana, que incluye a una célula madre hematopoyética o una célula humana CD34+. En una modalidad adicional, se trata la célula para estimular la proliferación celular sin una pérdida sustancial de la pluripotencia de la célula madre. En aspectos adicionales, se transduce la célula *in vivo* o *in vitro*. En modalidades adicionales, se introduce la célula transducida en un sujeto animal. El sujeto animal es un sujeto humano en una modalidad preferida.

Un ejemplo típico de una terapia génica *ex vivo* abarcada por la invención es un paciente que sufre de una enfermedad granulomatosa crónica (CGD), cuyas células CD34⁺ se pueden aislar de la médula ósea o de la sangre periférica y transducidas *ex vivo* con un lentivector que expresa al gen gp91phox antes de la reimplantación. En el caso de pacientes que sufren de inmunodeficiencia combinada severa (SCID), los inventores contemplan una aproximación similar, utilizando construcciones de vectores de la invención que expresan al gen defectuoso en el paciente, por ejemplo, al gen que codifica a la cadena gamma común del receptor de interleuquina. Para el tratamiento génico de la infección con VIH, los presentes inventores contemplan la inmunización intracelular, en donde las células se vuelven resistentes al virus del VIH a través de la introducción de genes antivirales. En modalidades de la inmunización intracelular para VIH, los objetivos de los vectores de la invención incluyen a progenitores hematopoyéticos, a células T CD4⁺ de sangre periférica, y a monocitos. Como lo reconocerá una persona capacitada en el arte, se pueden utilizar también, métodos similares de inmunización intracelular para otras infecciones virales. Para la inmunoterapia de cánceres, se modificarán por medio de ingeniería genética células tumorales o células que presentan antígeno tales como las células dendríticas, con los lentivectores de la invención. Para terapias contra el cáncer, algunos transgenes que pueden ser utilizados en las construcciones del lentivector de la invención son aquellas que pueden inhibir, y/o matar, y/o prevenir la proliferación, y/o mediar la apoptosis de la célula cancerosa/tumoral y/o de genes tales como el TNF.

Las partículas del vector descritas aquí pueden ser utilizadas también *in vivo*, por medio de inyección directa en la sangre o dentro de un órgano específico. Por ejemplo, en una modalidad se pueden utilizar inyecciones dentro del cerebro de lentivectores que expresan al Factor de Crecimiento Neural Derivado de Células Gliales (GDNF), para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. En otro ejemplo, se vislumbra la inyección intraportal del lentivector que expresa al factor de coagulación VIII para la corrección de la hemofilia A. En aún otro ejemplo, se vislumbra una inyección intravenosa o intramuscular de un lentivector de la presente invención que expresa al gen de la distrofina para el tratamiento de la Distrofia Muscular de Duchenne. De este modo, alguien normalmente capacitado en el arte apreciará el amplio uso de las construcciones del vector y de partículas de la presente invención en términos de terapias génicas.

Como se la utiliza aquí, la descripción o la(s) reivindicación(es) cuando se la(s) utiliza junto con las palabras “que incluye”, las palabras “un” o “una” puede(n) significar uno o más de uno. Como se la utiliza aquí “otra” puede significar al menos una segunda o más.

Otros objetivos, características y ventajas de la presente invención se harán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada.

Breve descripción de los dibujos

Los siguientes dibujos forman parte de la presente descripción y se los incluye para demostrar adicionalmente ciertos aspectos de la presente invención. Se puede entender mejor la invención haciendo referencia a uno o más de estos dibujos junto con la descripción detallada de modalidades específicas presentadas aquí.

Fig. 1A. *Generación de vectores derivados de SIVmac251*. El genoma de un clon molecular infeccioso de SIVmac (SIVmac251).

Fig. 1B. *Se utilizó SIVmac251 para obtener construcciones que codifican las funciones de empaquetamiento y las construcciones que transportan al vector de transferencia*. Se diseñaron también construcciones de expresión que expresan a diferentes glicoproteínas virales (GP). Las cajas rellenas representan a los genes virales. Las cajas sin relleno muestran a las secuencias que actúan como cis. LTR, repetición terminal larga; CMV, promotor inmediato temprano de citomegalovirus humano; PBS, sitio de enlazamiento del iniciador; MSD, sitio principal de empalme del donante; ψ , secuencia de empaquetamiento; RRE, elemento sensible a Rev; P_{HMG}, promotor de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMG); poli A, sitio de poliadenilación; SD, sitio de empalme del donante; SA, sitio de empalme del aceptor; SV40, promotor temprano del virus simio 40. Se produjeron las partículas del vector por medio de cotransfección de plásmidos que albergan las funciones de empaquetamiento, las glicoproteínas virales y al vector de transferencia en las células 293T. Se recogieron los sobrenadantes de las células transfectadas durante la expresión transitoria, se los concentró por medio de ultracentrifugación, y se los utilizó para la transducción de células objetivo.

Fig. 2A. *Títulos infecciosos de vectores derivados de SIVmac pseudotipados con diferentes glicoproteínas virales*. Se generaron vectores que transportan al gen marcador para la GFP con los GP indicados de origen retroviral o no retroviral (asteriscos). EboV, virus del Ébola; FPV-HA, hemaglutinina del virus de la plaga de las aves de corral; GALV, virus de leucemia del mono Gibón; MLV-A, virus anfitriónico de leucemia de murido; LCMV, virus de la coriomeningitis linfocítica; VSV, virus de la estomatitis vesicular. Se infectaron células objetivo TE671 con diluciones de preparaciones no concentradas de vectores y se determinó el porcentaje de células positivas para GFP 3 días después de la infección. Se calcularon los títulos infecciosos como i.u./ml de GFP. En experimentos por duplicado, se trataron células productoras de vectores que expresan al FPV-HA con 2U de neuraminidasa de *Clostridium perfringens* (Sigma-Aldrich, Francia) durante 24 horas para inducir la liberación de partículas pseudotipadas de HA de la superficie de las células productoras (FPV-HA + NA).

Fig. 2B. Representación esquemática de la GP quimérica RD114/TR en la cual el dominio citoplasmático de la glicoproteína RD 114 fue reemplazado con aquel de la GP MLV-A. Se muestran las secuencias de los tres dominios topológicos, del ectodominio, de la cola citoplasmática y transmembrana. Se modificó la GP quimérica GALV/TR en una forma similar.

Fig. 2C. Se evaluó la incorporación de las GP RD114 y de RD114/TR en viriones en inmunotransferencias de partículas del vector SIV precipitadas a través de cojines de sacarosa al 20%, utilizando anticuerpos anti-RD114SU y anti-CA. Se muestra la posición de los marcadores de peso molecular (kDa).

Fig. 3A. *Caracterización de estirpes del vector pseudotipado con base en SIV*. Títulos infecciosos de las estirpes del vector con base en SIVmac pseudotipadas con las GP indicadas y concentradas por ultracentrifugación. Se muestran los títulos promedio $\pm$ SD de nueve experimentos individuales llevados a cabo sobre células objetivo TE671.

Fig. 3B(B). Se llevó a cabo la detección de partículas físicas por medio de inmunotransferencias de estirpes representativas de vectores purificados utilizando anticuerpos anti-SrV-CA (cápside).

Fig.4A. *Estabilidad de viriones del vector pseudotipado del SIV en suero humano*. Se mezclaron partículas infecciosas del vector pseudotipado del SIV (50.000 i.u. de la GFP en 50 μ l de amortiguador de suspensión) con 50 μ l de

sueros humanos frescos (barras punteadas) o inactivados por calor (barras negras). Como referencia, se mezclaron los viriones con 50 μ l de suero fetal de ternera inactivado por calor (FCS). Se incubaron mezclas de viriones/sueros a 37°C durante una hora y luego se las utilizó para transducir células objetivo TE671. Los valores muestran los títulos de los viriones incubados en sueros de primate con relación a los títulos de los mismos viriones incubados en FCS (%). Se muestran los resultados de los experimentos llevados a cabo con sueros de tres diferentes donantes individuales. Se llevaron a cabo los experimentos con suero humano # 659 por triplicado y se muestran los valores como los valores promedio $\pm$ SD.

Fig. 4B. *Estabilidad de viriones del vector pseudotipado del SIV en sueros de macaco*. Se mezclaron partículas infecciosas del vector pseudotipado del SIV (50.000 i.u. de la GFP en 50 μ l de amortiguador de suspensión) con 50 μ l de sueros frescos de macaco (barras punteadas) o inactivados por calor (barras negras). Como referencia, se mezclaron los viriones con 50 μ l de suero fetal de ternera inactivado por calor (FCS). Se incubaron mezclas de viriones/sueros a 37°C durante una hora y luego se las utilizó para transducir células objetivo TE671. Los valores muestran los títulos de los viriones incubados en sueros de primate con relación a los títulos de los mismos viriones incubados en FCS (%). Se muestran los resultados de los experimentos llevados a cabo con sueros de tres diferentes donantes individuales. Se llevaron a cabo los experimentos con suero humano # 659 por triplicado y se muestran los valores como los valores promedio $\pm$ SD.

Fig. 5A. *Transducción de células CD34⁺ humanas y de macaco*. Las células CD34⁺, derivadas de sangre humana movilizadas fueron previamente estimuladas por medio de incubación durante la noche con TPO y fueron transducidas durante 16 horas con diferentes multiplicidades de infección (MOI) con vectores del SIV pseudotipados con VSV-G (triángulos), GP del MLV-A (círculos rellenos), GP GALV/TR (círculos sin relleno) o GP RD 114/TR (cuadrados rellenos). Para cada muestra de células CD34⁺, se llevaron a cabo las transducciones por duplicado: en presencia o en ausencia de polipéptidos de retronectina CH-296 recubiertos sobre las placas. Después de la infección, se lavaron las células en PBS y se las cultivó en presencia de Flt3-L, TPO, y SCF durante 3 días adicionales hasta que se evaluó la eficiencia de la transducción. Se muestran las curvas de respuesta a la dosis de experimentos representativos para los mismos lotes de células CD34⁺ así como los análisis estadísticos de las eficiencias máximas de transducción de al menos cuatro experimentos llevados a cabo con células CD34⁺ derivadas de diferentes donantes y estirpes de vectores pseudotipados.

Fig. 5B. *Transducción de células CD34⁺ humanas y de macaco*. Las células CD34⁺, derivadas de médula ósea de macaco cinomólogo fueron previamente estimuladas por medio de incubación durante la noche con TPO y fueron transducidas durante 16 horas con diferentes multiplicidades de infección (MOI) con vectores del SIV pseudotipados con VSV-G (triángulos), GP del MLV-A (círculos rellenos), GP GALV/TR (círculos sin relleno) o GP RD 114/TR (cuadrados rellenos). Para cada muestra de células CD34⁺, se llevaron a cabo las transducciones por duplicado: en presencia o en ausencia de polipéptidos de retronectina CH-296 recubiertos sobre las placas. Después de la infección, se lavaron las células en PBS y se las cultivó en presencia de Flt3-L, TPO, y SCF durante 3 días adicionales hasta que se evaluó la eficiencia de la transducción. Se muestran las curvas de respuesta a la dosis de experimentos representativos para los mismos lotes de células CD34⁺ así como los análisis estadísticos de las eficiencias máximas de transducción de al menos cuatro experimentos llevados a cabo con células CD34⁺ derivadas de diferentes donantes y estirpes de vectores pseudotipados.

Fig. 6A. *Transducción de linfocitos de sangre periférica humana*. Se transdujeron los linfocitos de sangre periférica (PBL) de origen humano con los pseudotipos indicados del vector del SIV con diferentes multiplicidades de infección (MOI). Se activaron los PBL humanos con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 solubles durante 24 horas. Se activaron los PBL de macaco con concanavalina A y rIL2 durante 2 días antes de la infección. Se infectaron los PBL activados durante 4 horas con vectores del SIV pseudotipados con VSV-G (triángulos), GP del MLV-A (círculos rellenos), GP GALV/TR (círculos sin relleno) o GP RD 114/TR (cuadrados rellenos). Se lavaron las células infectadas en PBS, se las cultivó en medio de cultivo de PBL y se evaluó la eficiencia de la transducción cinco días después de la infección. Se muestran los resultados de los experimentos llevados a cabo con los PBL de diferentes donantes, así como los análisis estadísticos de las eficiencias máximas de transducción de al menos cuatro experimentos llevados a cabo con los PBL derivados de diferentes donantes y estirpes de vectores pseudotipados.

Fig. 6B. *Transducción de linfocitos de sangre periférica de macaco*. Se transdujeron los linfocitos de sangre periférica (PBL) originados en macaco cinomólogo con los pseudotipos indicados del vector del SIV con diferentes multiplicidades de infección (MOI). Se activaron los PBL humanos con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 solubles durante 24 horas. Se activaron los PBL de macaco con concanavalina A y rIL2 durante 2 días antes de la infección. Se infectaron los PBL activados durante 4 horas con vectores del SIV pseudotipados con VSV-G (triángulos), GP del MLV-A (círculos rellenos), GP GALV/TR (círculos sin relleno) o GP RD 114/TR (cuadrados rellenos). Se lavaron las células infectadas en PBS, se las cultivó en medio de cultivo de PBL y se evaluó la eficiencia de la transducción cinco días después de la infección. Se muestran los resultados de los experimentos llevados a cabo con los PBL de diferentes donantes, así como los análisis estadísticos de las eficiencias máximas de transducción de al menos cuatro experimentos llevados a cabo con los PBL derivados de diferentes donantes y estirpes de vectores pseudotipados.

Fig. 7A. *Representación de mutantes de la cola citoplasmática de la GP RD114*. Alineación de las subunidades TM de la GP RD114 con los TM de las glicoproteínas Env del retrovirus de mamífero tipo C (MLV-A) o tipo D (virus del mono Mason-Pfizer - MPMV). (:) muestra los aminoácidos idénticos en los TM de MLV-A y MPMV en relación con aquellos de RD114. Los aminoácidos conservados tales como I, L o V para residuos alifáticos; K o R para residuos

cargados positivamente y D o E para residuos cargados negativamente, están resaltados. El dominio transmembrana (M) de las diferentes GP está en una caja. La cola citoplasmática está formada por dos segmentos: la cola (T) de la GP madura encontrada sobre viriones después de la remoción del extremo carboxi-terminal de la GP (R) por la proteasa del núcleo viral. Se muestran los sitios de escisión de la proteasa (entre cajones) y el motivo de endocitosis YXXL (subrayado) en las diferentes GP.

Fig. 7B. Las secuencias de los extremos carboxi-terminales que fueron modificados en las GP RD114 están subrayados para cada mutante. Únicamente los dominios transmembrana de las diferentes GP quiméricas están entre una caja. (*) Muestra la posición del codón de detención prematuro insertado en la GP quimérica RDRless. (') Representa la posición de escisión mediada por la proteasa del núcleo viral.

Fig. 8. *Resultados de los análisis de sincitios*. La fusogenicidad célula-célula de las quimeras de GP determinada por el recuento del número de sincitios en células transfectadas sembradas en pozos de 2 cm². Se utilizaron células transfectadas de Mock (sin GP) para determinar el número de fondo de sincitios (restado aquí). Los datos representan los resultados de tres experimentos independientes.

Fig. 9A. *Infectividad de los pseudotipos de vectores*. Infectividad de los vectores del MLV pseudotipados con los mutantes indicados de GP como i.u./ml de GFP. La gráfica muestra el promedio $\pm$ SD de cuatro experimentos independientes. También se muestran los resultados obtenidos con vectores pseudotipados ya sea con la GP del MLV-A o con VSV-G, para comparación.

Fig. 9B. *Infectividad de los pseudotipos de vectores*. Infectividad de los vectores del MLV pseudotipados con los mutantes indicados de GP como i.u./ml de GFP. La gráfica muestra el promedio $\pm$ SD de cuatro experimentos independientes. También se muestran los resultados obtenidos con vectores pseudotipados ya sea con la GP del MLV-A o con VSV-G, para comparación.

Descripción de modalidades ilustrativas

Hemos elaborado las GP quiméricas que codifican a los dominios extracelular y transmembrana de GALV o las GP RD114 fusionadas a la cola citoplasmática (denominada TR) de la GP del MLV-A. Sorprendentemente, los vectores derivados del SIV pseudotipados con estas quimeras de la GP GALV/TR y de RD114/TR tengan títulos significativamente más altos que los vectores recubiertos con las GP parentales. Adicionalmente, los vectores pseudotipados de RD114/TR están eficientemente concentrados y son resistentes a la inactivación inducida por el complemento tanto de sueros humano como de macaco. Los vectores lentivirales pseudotipados modificados de la GP de RD 114 son por lo tanto de valor particular para aplicaciones de transferencia génica *in vivo*. Además, comparado con los vectores pseudotipados con otras GP retrovirales o con VSV-G, los vectores pseudotipados de RD 114/TR muestran una transducción aumentada de las células CD34⁺ y de los linfocitos de sangre primaria de humano y de macaco.

Además, los mutantes de la GP RD114 que sufren alteraciones en sus dominios transmembrana y/o en sus colas citoplasmáticas pueden modular la formación de pseudotipos ya sea con partículas del núcleo viral del MLV, SIV o de VIH-1. Demostramos que un sitio de escisión compatible con la proteasa del núcleo retroviral debe estar presente en la cola citoplasmática de la GP RD114 para permitir un pseudotipado eficiente. Aunque la incompatibilidad del sitio de escisión con la proteasa del MLV altera la infectividad de los viriones pseudotipados pero no la incorporación de GP en núcleos del MLV, la compatibilidad del sitio de escisión con la proteasa lentiviral condiciona tanto la incorporación de GP como la infectividad de los núcleos lentivirales pseudotipados. Existe por lo tanto, una nueva ruta de ensamblaje viral por medio de la cual los determinantes albergados por la cola citoplasmática de una GP que restringe su incorporación sobre núcleos lentivirales deben ser removidos por la proteasa viral para permitir la incorporación de la GP y la infectividad de viriones pseudotipados.

1. La cola citoplasmática de la GP RD 114 controla la fusogenicidad célula-célula y virus-célula

Para las GP del retrovirus de mamífero tipo C y tipo D, la cola citoplasmática es de importancia central en el proceso que regula tanto el montaje viral como la fusogenicidad. Varias evidencias establecen su influencia sobre la localización de la proteína, la densidad en la superficie de la célula, la fusión célula-célula, la interacción/incorporación con núcleos virales heterólogos u homólogos y la infectividad de los viriones. La cola citoplasmática de estas GP es un motivo estructural que contiene un péptido carboxi-terminal, llamado R, que aloja una señal de endocitosis de tirosina - YXXL - (5), y cuya escisión por la proteasa viral modula fuertemente las propiedades de la GP. En la forma nativa de la GP, antes de la escisión, se piensa que el péptido R interactúa i) con el complejo de adaptina de la maquinaria de la endocitosis celular, ii) con el extremo carboxi-terminal de la GP madura encontrado en viriones (dominio T de la cola citoplasmática en la Fig. 1A) y iii) con proteínas internas del virión (1, 8, 13, 14, 17, 19, 43). La caracterización de los mutantes de la glicoproteína RD114 (este reporte) indica la existencia de señales relacionadas transportadas por su cola citoplasmática. De este modo, las GP del mutante RD Δ YXXL, en el cual se rompió el motivo YXXL por medio de mutagénesis puntual, conducen a una mayor fusión célula-célula muy probablemente a través de una mayor expresión en la superficie de la célula, como lo sugieren los estudios de otros investigadores utilizando distintos oncoretrovirales y glicoproteínas lentivirales (1, 8, 13). Sin embargo, las mutaciones que incrementan la fusogenicidad célula-célula y/o la expresión en la superficie de la célula no necesariamente pueden mejorar la incorporación viral

y/o la infectividad viral, como se infiere por medio de la caracterización de las GP mutantes RDRless, RDP^rMLV, RDP^rSIV_{RQAG}, RDP^rHIV y RDΔYXXL. Adicionalmente, nuestros datos indican que la infectividad de los vectores pseudotipados depende de la compatibilidad entre las colas citoplasmáticas - modificadas - de la GP RD114 y del tipo de núcleo viral.

Varias evidencias genéticas obtenidas con otras GP del retrovirus de mamífero tipo C y D indican que la cola citoplasmática en su forma - celular - no escindida actúa tanto como un regulador negativo intrínseco de la fusogenicidad de GP (2, 14, 17, 30, 33, 43) y como un socio de la proteína matriz durante el montaje del virión (2, 3). Los resultados obtenidos con los mutantes CT de la glicoproteína RD114 indican que el control de la fusión de esta última GP está modulado por su cola citoplasmática en una forma similar a aquella de las glicoproteínas del tipo C y D. En realidad se encontró esencial la escisión de la cola citoplasmática para activar el potencial de fusión para diferentes glicoproteínas de tipo C y D (2, 14, 30, 33), a través de un mecanismo aún no definido. La falta de escisión de la CT da como resultado glicoproteínas pobremente fusogénicas. También, una escisión prematura, lograda a través de la inserción de un codón de detención en la posición de la escisión, mejora fuertemente la formación de sincitios (2, 3, 33). Además, nuestros datos confirman directamente que el extremo carboxi-terminal de la GP RD114 debe ser escindido durante o después del montaje del virión para permitir la infectividad (Fig. 5). Las mutaciones adicionales ya sea en la región que forma la cola citoplasmática madura (dominio T - Fig. 1B) o en el péptido R alteran el control de la fusión célula-célula (14, 17, 43) muy probablemente como resultado del rompimiento de la estructura y/o de la integridad de esta cola citoplasmática. Así mismo, los mutantes de la GP RD114 que soportan varias mutaciones en la cola citoplasmática, por ejemplo, los mutantes RDP^rMLV, RDP^rSIV_{RQAG} y RDP^rHIV pueden tener mejor toxicidad debido a la pérdida del control inhibitorio de la fusión por sus colas citoplasmáticas mutadas.

2. Una nueva ruta de formación del pseudotipo con núcleos lentivirales

Las modificaciones de la cola citoplasmática de la GP RD 114 tuvieron poco efecto sobre la incorporación de las quimeras de GP RD 114 sobre los núcleos de MLV, en contraste con los núcleos lentivirales (Fig. 4). Esto indica que los núcleos oncoretrovirales son más permisivos que los núcleos lentivirales para la incorporación de GP, o, alternativamente, que los determinantes de incompatibilidad transportados por la GP RD 114 estaban restringidos a núcleos lentivirales. Sin embargo, la infectividad de las partículas del vector MLV pseudotipado estaba más influenciada por el tipo de sitio de escisión introducido en la cola citoplasmática de las quimeras de GP RD 114 (Fig. 3). Aunque el remplazo del sitio de escisión de GP RD 114 con aquel de MLV no tuvo efecto sobre la infectividad, la inserción de sitios de escisión lentivirales disminuyen dramáticamente la infección. Consistente con el progreso deficiente de las colas citoplasmáticas de las proteínas TM de estos últimos mutantes cuando se las incorpora sobre partículas del núcleo de MLV (Fig. 5A), estos resultados sugieren que la pobre infectividad de estos últimos pseudotipos del vector se debió a la falta de activación del potencial de fusión de las quimeras incorporadas de GP. Para la GP MLV, la abolición de la escisión de la cola citoplasmática, lograda a través de mutaciones del mismo sitio de escisión o de la proteasa viral, resultó en mutantes que incorporaron niveles normales de GP pero que no fueron infecciosos (33).

En forma muy interesante, la baja infectividad de los vectores de SIV pseudotipados con GP RD 114 de tipo silvestre no podía ser explicada únicamente por incompatibilidad del sitio de escisión de su cola citoplasmática con la proteasa del núcleo lentiviral. En realidad, nuestros datos sugieren que, en contraste con la GP MLV-A, la cola citoplasmática de la glicoproteína no modificada RD 114 puede que no permita interacciones óptimas con el núcleo lentiviral, evitando una incorporación eficiente de esta última GP (Fig. 4). El examen de las propiedades de las quimeras de GP RD 114 puede proporcionar una base molecular para esta interacción negativa. En realidad, el reemplazo de la cola citoplasmática de la glicoproteína RD 114 con aquella de la GP MLV-A competente para la incorporación, resultó en una incorporación viral incrementada hasta en 10 veces (Fig. 4), demostrando que la cola citoplasmática de la GP RD 114 contiene determinantes de incompatibilidad con el núcleo lentiviral. En forma muy interesante, se podría restablecer la compatibilidad por medio de la introducción de cambios en la especificidad del sitio de escisión de su cola citoplasmática. Una posibilidad es que tales cambios pueden haber inducido modificaciones estructurales de la cola citoplasmática que resultaron en interacciones optimizadas con el núcleo de SIV, por ejemplo, por medio de la reducción de incompatibilidades estéricas con las proteínas de la matriz de SIV. A pesar de todo, nuestros datos también sugieren la posibilidad alternativa, no exclusiva, de que la escisión de la cola citoplasmática podría estar asociada a la incorporación de GP. Las sustituciones del sitio de escisión de GP RD 114 con sitios de escisión derivados ya sea de la cola citoplasmática de la GP MLV-A competente para pseudotipado (mutante RDP^rMLV) o de las proteínas Gag de SIV (mutante RDP^rSIV_{RQAG}) resultaron en el mejoramiento tanto de la incorporación de las partículas del núcleo de SIV como de los títulos virales, con la excepción del mutante de la GP RDP^rSIV_{ARLM}. En un estudio reciente relacionado, Cannon y colaboradores, encontraron que la GP no modificada de GALV fueron excluidas de la incorporación sobre los núcleos de VIH-1 (4). El truncamiento del péptido R así como el remplazo ya sea de la CT de GALV o de su sitio de escisión con las secuencias correspondientes derivadas de MLV-A resultó tanto en la mayor incorporación de GP como en los títulos virales (4), de acuerdo con nuestros datos obtenidos con un tipo distinto de glicoproteína retroviral. Colectivamente estos datos sugieren por lo tanto que la infectividad de los vectores lentivirales pseudotipados es el resultado de la compatibilidad de la CT de la glicoproteína de pseudotipado con el núcleo viral y puede ser modulada a través de su escisión por medio de la proteasa del núcleo viral. Aunque estas hipótesis deben ser confirmadas por medio de la evaluación directa por escisión de la cola citoplasmática, prevemos la posibilidad de una relación entre la escisión de la cola citoplasmática y la incorporación de GP sobre núcleos no permisivos. A pesar de la localización de las glicoproteínas oncoretrovirales en balsas de lípido en la membrana plasmática (29), donde los lentivirus han mostrado que inician la gemación (25), es posible que las colas citoplasmáticas de estas GP

no escindidas no sean compatibles con la red de proteínas de la matriz. La presencia de poca proteasa lentiviral activa en cercanías del sitio del montaje viral puede escindir luego las colas citoplasmáticas de estas GP en una forma que depende de su compatibilidad con el sitio de escisión alojado por sus CT. Esto resultaría en la remoción del péptido R y por lo tanto en la eliminación de los determinantes de incompatibilidad que evitaban la incorporación sobre los núcleos lentivirales. Las GP confeccionadas se pueden incorporar luego sobre partículas lentivirales siguiendo posiblemente un mecanismo pasivo de incorporación.

3. Vectores Virales

Los virus de muchos tipos han formado las bases para los vectores. La infección por virus involucra la introducción del genoma viral dentro de la célula huésped. Esa propiedad es la elegida para ser usada como vehículo de suministro de genes en vectores con base viral. Los virus utilizados se derivan a menudo de especies virales patógenas que ya tienen muchas de las características necesarias y habilidades para transfectar células. Sin embargo, no todos los virus transfectarán exitosamente todos los tipos de células en todas las etapas del ciclo celular. Por lo tanto, en el desarrollo de vectores virales, a menudo se modifican los genomas virales para mejorar su utilidad y efectividad para introducir construcciones génicas foráneas (transgenes) u otros ácido nucleicos. Al mismo tiempo, se pueden introducir modificaciones que reduzcan o eliminen su habilidad para provocar enfermedades.

Los lentivirus son un subgrupo de retrovirus que pueden infectar células que no se dividen debido a las propiedades carioplílicas de su complejo de preintegración, que permite su importe activo a través del nucleoporo. Correspondientemente, los vectores lentivirales derivados del virus tipo I de inmunodeficiencia humana (VIH-1) pueden mediar el suministro eficiente, la integración y expresión a largo plazo de los transgenes dentro de células no mitóticas tanto *in vitro* como *in vivo* (Naldini y colaboradores, 1996a; Naldini y colaboradores, 1996b; Biemer y colaboradores, 1997). Por ejemplo, los vectores con base en VIH pueden transducir eficientemente células hematopoyéticas humanas CD34⁺ en ausencia de estimulación por citoquina (Akina y colaboradores, 1996; Sutton y colaboradores, 1998; Uchida y colaboradores, 1998; Miyoshi y colaboradores, 1999; Case y colaboradores, 1999), y estas células son capaces de injertarse a largo plazo en ratones NOD/SCID (Miyoshi y colaboradores, 1999). Además, la médula ósea de estos receptores primarios puede repoblar a ratones secundarios con células transducidas, confirmando la modificación genética mediada por lentivectores de precursores hematopoyéticos muy primitivos, más preferiblemente células madre auténticas. Ya que ninguno de los otros sistemas de suministro génico actualmente disponibles tienen tal habilidad, los vectores lentivirales proporcionan una base previamente no explorada para el estudio de hematopoyesis y fenómenos similares, y para la terapia génica de trastornos heredados y adquiridos a través de la modificación genética de células madre humanas (HCL).

Esta importante capacidad es objeto de significativas preocupaciones de bioseguridad (Akina y colaboradores, 1996; Sutton y colaboradores, 1998; Uchida y colaboradores, 1998). La generación accidental de recombinantes competentes para replicación (RCR) durante la producción de estirpes de vectores lentivirales representa uno de los principales problemas que debe ser resuelto antes de que los vectores lentivirales puedan ser considerados para terapia génica en humanos.

En el genoma retroviral, una molécula única de ARN que también contiene todos los elementos necesarios para actuar en forma *cis* transporta todas las secuencias de codificación. La bioseguridad de un sistema de producción de un vector se logra mejor por lo tanto distribuyendo las secuencias que codifican a sus diferentes componentes en tantas unidades independientes como sea posible, para maximizar el número de cruzamientos que se requerirían para recrear una RCR. Las partículas del lentivector se generan por medio de la coexpresión de los elementos de empaquetamiento del virión y del genoma del vector en células productoras huésped, por ejemplo, células 293 embrionarias de riñón humano. En el caso de los vectores con base en VIH-1, el núcleo y los componentes enzimáticos del virión provienen de VIH-1, mientras que la proteína de la envoltura se deriva de un virus heterólogo, más a menudo VSV. La complejidad genómica del VIH, donde un juego completo de genes codifica a los factores de virulencia esenciales para patogénesis pero prescindible para la transferencia de la carga genética del virus, ayuda sustancialmente al desarrollo de sistemas de vectores clínicamente aceptables.

Los sistemas de empaquetamiento atenuados en forma múltiple típicamente incluyen ahora únicamente tres de los nueve genes del VIH-1: *gag*, que codifican a las proteínas estructurales principales del virión, *pol*, responsables por las enzimas específicas del retrovirus, y *rev*, que codifica a un regulador pos-transcripcional necesario para expresión eficiente de *gag* y de *pol* (Dull y colaboradores, 1998). A partir de un sistema de empaquetamiento tan extensamente suprimido, el virus parental no puede ser reconstituido, ya que algo así como el 60% de su genoma ha sido completamente eliminado. En una versión de un sistema de empaquetamiento con base en el VIH, se producen G de Gag/Pol, de Rev, de VSV y el vector a partir de cuatro unidades separadas de ADN. También, la superposición entre las secuencias auxiliares y las del vector se ha reducido hasta unas pocas decenas de nucleótidos de modo que se minimizan las oportunidades de recombinación homóloga.

Se pueden generar las partículas del vector con base en el VIH tipo 1 (VIH-1) por coexpresión de los elementos de empaquetamiento del virión y el genoma del vector en la así llamada célula productora, por ejemplo, células 293T de riñón embrionario humano. Estas células pueden ser transfectadas en forma transitoria con una cantidad de plásmidos. Típicamente, se emplean de tres a cuatro plásmidos, pero el número puede ser mayor dependiendo del grado en el cual se rompen los componentes lentivirales en unidades separadas. Generalmente, un plásmido codifica

al núcleo y a los componentes enzimáticos del virión, derivados del VIH-1. Este plásmido es llamado el plásmido de empaquetamiento. Otro plásmido codifica la(s) proteína(s) envolvente(s), más comúnmente la proteína G de virus de la estomatitis vesicular (G de VSV) debido a su alta estabilidad y amplio tropismo. Este plásmido puede ser llamado el plásmido de expresión de la envoltura. Incluso otro plásmido codifica al genoma que va a ser transferido a la célula huésped, esto es, el mismo vector, y es llamado el vector de transferencia. Se pueden generar virus recombinantes con títulos de varios millones de unidades de transducción por mililitro (TU/ml) por medio de esta técnica y variantes de los mismos. Después de ultracentrifugación se pueden obtener patrones concentrados de aproximadamente 10^9 TU/ml.

El vector en sí mismo es el único material genético transferido a las células objetivo. Comprende típicamente al casete del transgén flanqueado por elementos que actúan en forma cis necesarios para su encapsidación, transcripción inversa, importe e integración nuclear. Como se ha hecho previamente con vectores oncoretrovirales, se han elaborado vectores lentivirales que son “auto-inactivadores” ya que pierden la capacidad transcripcional de la repetición terminal larga viral (LTR) una vez transferidos a células objetivo (Zufferey y colaboradores, 1998). Esta modificación reduce más el riesgo de surgimiento de recombinantes competentes de replicación (RCR) y evita problemas relacionados con la interferencia del promotor.

4. Vectores Virales de Pseudotipado

La incorporación de la proteína en retrovirus no es específica para las glicoproteínas virales homólogas. Se han identificado más de 40 proteínas diferentes derivadas de la célula huésped en el exterior de las partículas virales del VIH-1, incluyendo complejos mayores de histocompatibilidad clase I (MCH-I) y moléculas MCH-II, moléculas de adhesión, moléculas de coestimulación y proteínas de control del complemento⁴⁸. Adicionalmente, se pueden incorporar muchas glicoproteínas virales heterólogas en partículas de retrovirus y que median en la infectividad⁴⁹. Este proceso, conocido como pseudotipado, permite que vectores retrovirales conviertan un amplio rango de células y de tejidos. Las modificaciones genéticas de vectores lentivirales con la glicoproteína G de VSV ejemplifica la habilidad de una glicoproteína heteróloga para extender el tropismo de un vector². Sin embargo, la coexpresión de una glicoproteína dada (GP) con un núcleo viral heterólogo no necesariamente dará lugar a partículas virales altamente infecciosas^{8, 14, 15, 50}.

Se puede derivar el gen *env* de cualquier virus, incluidos los retrovirus. Los ejemplos de genes *env* derivados de retrovirales incluyen, pero no se limitan a: el virus de leucemia de muido de Moloney (MoMuLV o MMLV), el virus de sarcoma de muido de Harvey (HaMuSV o HSV), el virus de tumor mamario de muido (MuMTV o MMTV), el virus de leucemia de mono Gibón (GaLV o GALV), el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y el virus del sarcoma de Rous (RSV). También se pueden utilizar otros genes *env* tal como aquellos para la proteína G del virus de la estomatitis Vesicular (VSV) (G de VSV), diferentes a los de los virus de la hepatitis y de la influenza.

Aunque la proteína de VSV G es un gen *env* deseable debido a que VSV G confiere un amplio rango como hospedadores sobre el virus recombinante, VSV G puede ser nociva para la célula huésped, por ejemplo la célula de empaquetamiento. De este modo, cuando se utiliza un gen tal como aquel para VSV G, se puede emplear un sistema promotor inducible para que se pueda regular la expresión de VSV G para minimizar la toxicidad del huésped cuando no se requiere la expresión de VSV G. Por ejemplo, se puede emplear el sistema de expresión del gen regulado por la tetraciclina de Gossen & Bujard (1992), para proporcionar una expresión inducible de VSV G cuando se retira la tetraciclina de la célula transferida. De este modo, el transactivador tet/VP26 está presente sobre un primer vector y la secuencia de codificación de VSV G se clona secuencia debajo de un promotor controlado por las secuencias del operador tet sobre otro vector.

El vector que proporciona la secuencia de ácido nucleico viral de *env* está operativamente asociado con secuencias reguladoras, por ejemplo, un promotor o un potenciador. La secuencia reguladora puede ser cualquier promotor eucariota o potenciador, incluyendo por ejemplo, EF1 α , PGK, el elemento promotor-potenciador del virus de leucemia de muido de Molony, el potenciador del citomegalovirus humano, el promotor P7.5 de la vacuna o similares (ver también los ejemplo enlistados en las Tablas 1 y 2 más adelante). En algunos casos, tal como el elemento promotor-potenciador del virus de la leucemia de muido de Molony, los elementos promotores-potenciadores están localizados dentro o adyacentes a las secuencias LTR. Preferiblemente, la secuencia reguladora es una que no es endógena al lentivirus a partir del cual se está construyendo el vector. De este modo, si se está elaborando el vector a partir de SIV, la secuencia reguladora del SIV encontrada en la LTR de SIV sería remplazada por un elemento regulador que no se origina a partir del SIV.

Uno puede reconocer además al virus recombinante por enlazamiento de la proteína de la envoltura con un anticuerpo o un ligando particular para el reconocimiento con un receptor de un tipo particular de célula. Por medio de la inserción de una secuencia (incluyendo una región reguladora) de interés dentro del vector viral, junto con otro gen que codifica al ligando para un receptor sobre una célula blanco específica, por ejemplo, el vector es ahora específico para reconocimiento. Se pueden elaborar vectores retrovirales específicos para reconocimiento por medio de la inserción, por ejemplo de un glicolípido o una proteína. El reconocimiento se logra a menudo utilizando por medio de la utilización de una porción de enlazamiento con el antígeno de un anticuerpo o de una molécula recombinante tipo anticuerpo, tal como un anticuerpo de cadena sencilla, para reconocer al vector retroviral.

Se cree que dos tipos de mecanismos conducen al montaje de glicoproteína homólogas y heterólogas, virales, o celulares sobre partículas virales. El modelo pasivo de incorporación de GP implica interacciones no obligatorias entre la glicoproteína de pseudotipado y el núcleo viral, con tal de que el anterior sea suficientemente abundante en el sitio de gemación del virus⁵¹ y que su cola citoplasmática no soporte determinantes que sean estéricamente incompatibles con el montaje viral o la morfología del virión⁴⁹. En este sentido, las GP heterólogas que albergan colas citoplasmáticas cortas tal como aquellas de FPV, LCMV y VSV (Fig. 2) probablemente son incorporadas en partículas lentivirales a través de un mecanismo pasivo. Por otro lado, en el modelo activo de incorporación de GP, las interacciones entre la cola citoplasmática de la glicoproteína de pseudotipado y los componentes del núcleo del virión dictan el montaje de las partículas virales. Existe una amplia evidencia en la literatura para soportar el papel crítico de tales interacciones en un montaje viral (revisadas en ^{39, 49}), al menos para lentivirus⁵²⁻⁵⁵.

En un estudio reciente propusimos que el pseudotipado del núcleo lentiviral con las glicoproteínas de retrovirus de mamífero de tipo C y D involucra una ruta alternativa de montaje¹⁴. Las GP de algunos de estos retrovirus, como el GALV y los virus RD 114, han mostrado que alojan en su cola citoplasmática a un determinante que restringe la incorporación sobre los núcleos lentivirales^{8, 14}. Las colas citoplasmáticas relativamente cortas de las GP de retrovirus de mamífero de tipo C/D, de aproximadamente 30 - 40 aminoácidos de longitud, albergan un péptido carboxi-terminal de 15 - 20 aminoácidos de longitud, llamado R para los MLV, cuya escisión por parte de la proteasa homóloga del núcleo viral es requerida para activar la fusión potencial de la glicoproteína⁵⁶⁻⁵⁸. Para la formación del pseudotipo con núcleos virales homólogos del tipo C/D, la falta de escisión del péptido R por parte de la proteasa viral altera la infectividad de los viriones pseudotipados pero no la incorporación de la GP^{14, 56, 58}. En contraste, la compatibilidad del sitio de escisión con la proteasa lentiviral afecta tanto la incorporación de la GP como la infectividad de las partículas pseudotipadas de los núcleos lentivirales¹⁴. De este modo, una ruta posible para la incorporación de estas GP sobre los núcleos lentivirales puede involucrar la escisión del péptido R por medio de la proteasa del núcleo activo en el sitio de ensamblaje del virión, resultando en la escisión del determinante de la cola citoplasmática que afecta el pseudotipado. Con base en estas observaciones, hemos generado vectores eficientes derivados del SIV pseudotipados con las GP quiméricas derivadas de GALV⁸ y RD 114 (Fig. 2). Estas glicoproteínas mutantes, llamadas GALV/TR y RD 114/TR (Fig. 2), respectivamente albergan a la cola citoplasmática de la GP del MLV-A cuyo sitio de escisión es compatible con las proteasas de VIH-1 y SIV. Probablemente es debido a esta propiedad que se las incorpora eficientemente sobre partículas lentivirales (Fig. 2C).

5. Estabilidad de los pseudotipos del vector lentiviral en sueros de primate

Los vectores lentivirales pseudotipados con VSV-G han probado ser útiles para transducir varios tipos de células *in vivo* o *in vitro*³⁻⁷. Incluso su alta sensibilidad al complemento del primate humano²⁴ y no humano (Fig. 4) puede excluir su utilidad para administración para administración sistémica *in vivo*. En contraste con los pseudotipos de VSV-G, los vectores generados con glicoproteínas retrovirales fueron estables en sueros humanos y de macaco, siendo los vectores del SIV pseudotipados con RD 114/TR constantemente resistentes a sueros humanos, sugiriendo que estos últimos vectores podrían ser particularmente adecuados para suministro génico sistémico (Fig. 4). Varios factores contribuyen a determinar la sensibilidad del complemento y dependen de: i) los sueros de diferentes individuos, ii) del tipo de célula productora^{34, 36}, iii) de la presencia de un epítipo del azúcar $\alpha(1,3)$ galactosa en glicoproteínas⁵⁹⁻⁶¹ o iv) del tipo de pseudotipado de la GP^{34, 36, 62}. Los retrovirus producidos por células humanas son usualmente resistentes en suero humano^{34, 36}, con la excepción de los vectores pseudotipados con VSV-G²⁴. Sin embargo, en un estudio reciente, se ha encontrado que los vectores oncoretrovirales recubiertos con las GP del MLV y producidos por las células humanas fueron diferencialmente sensibles a la inactivación del complemento en sueros de primates no humanos Old World en una forma que se correlaciona con un incremento en la distancia evolucionaria con los humanos⁶³. La sensibilidad a los sueros de macaco resulta en una degradación del vector superior al 99%⁶³. De esta forma, en aparente desacuerdo con estos últimos resultados obtenidos con vectores oncoretrovirales, encontramos aquí que los vectores lentivirales pseudotipados con las GP retrovirales son relativamente estables en los sueros de macaco (Fig. 4B). Un factor que podría modular la respuesta a los sueros y explicar la discrepancia entre partículas oncoretrovirales y lentivirales puede ser la incorporación de las moléculas inhibitorias del complemento CD46, CD55 y CD59 dentro de las partículas lentivirales, como se reporta para el VIH y el SIV^{41, 64}.

6. Transducción de células primarias con vectores pseudotipados del SIV

El amplio tropismo de los vectores lentivirales pseudotipados con VSV-G puede no ser adecuado para aplicaciones particulares de transferencia génica en donde se requeriría el suministro génico específico para el tipo de célula. Los tropismos más selectivos se podrían lograr aprovechándose de los tropismos naturales de glicoproteínas derivadas de algunos virus envueltos con membrana o, alternativamente, por medio de modificación genética del rango como hospedadores de las GP competentes para incorporación (por ejemplo, MLV, GALV/TR o FPV-HA)^{65, 66}. Por ejemplo, el uso de glicoproteínas de superficie derivadas de virus pueden provocar la infección del pulmón e infectar a través del epitelio de las vías respiratorias, como el virus del Ébola o el virus de la influenza, pueden resultar útiles para terapia génica de las vías respiratorias humanas¹⁰. Sin embargo, debe observarse que los pseudotipos de vectores lentivirales podrían no retener siempre el rango como hospedadores de los virus parentales a partir de los cuales se derivaron las glicoproteínas para pseudotipado. Por ejemplo, aunque la glicoproteína del virus de Mokola, un lisavirus neurotrópico, hace eficientemente el pseudotipado de los vectores VIH-1¹², los vectores pseudotipados no reproducen el neurotropismo específico del virus parental⁹.

Reportes recientes han demostrado que los vectores oncoretrovirales pseudotipados con la GP RD 114 transducen eficientemente las células CD34⁺ humanas y de canino^{16-18, 21}. Las células transducidas podrían repoblar ratones y perros NOD/SCID con una eficiencia similar a aquella de las células no transducidas y que mostraron una expresión multilínea¹⁶⁻¹⁸. A partir de estos estudios, se sugirió que, en células CD34⁺ humanas, la “principal barrera para transferencia génica está a nivel del receptor y no es debida a la quiescencia de las células objetivo”¹⁸. Intentamos analizar esta hipótesis con vectores lentivirales pseudotipados con las glicoproteínas MLV-A, GALV/TR, RD 114 y VSV-G. En contraste con los anteriores estudios, utilizamos condiciones de infección que minimizarían la influencia de factores que pudieran afectar las interacciones y/o la transducción virus/receptor, esto es, infecciones no reiteradas, ausencia de retronectina o de células estromales y únicamente tratamiento mínimo con citoquina. De esta forma, se transdujeron las células CD34⁺ humanas por medio de una exposición única y corta de la célula/virus bajo tratamiento con citoquina que no permitiría que los vectores del MLV transdujeran a las células CD34⁺²⁶. Debido a estas condiciones por debajo del óptimo, los niveles máximos de transferencia génica fueron relativamente bajos; incluso permitieron una comparación confiable de la influencia específica de las GP para pseudotipado en la transducción de células CD34⁺. Las mejores glicoproteínas bajo estas condiciones fueron claramente las GP VSV-G y GALV/TR (Fig. 5A). Comparado con VSV-G, se lograron niveles de transducción mucho menores con vectores pseudotipados con las GPS de MLV-A y RD 114/TR. Estos resultados pueden reflejar diferencias en el patrón de expresión del receptor sobre las células CD34⁺ para las diferentes GP y parece contradecir aquellos resultados previamente reportados con vectores oncoretrovirales¹⁸. Sin embargo, de acuerdo con los estudios previos¹⁶⁻¹⁸, el uso combinado de la GP RD 114/TR y de retronectina incrementó fuertemente la transducción de células humanas, permitiendo que los vectores lentivirales pseudotipados con RD 114/TR superaran a aquellos pseudotipados con VSV-G (Fig. 5). Los mecanismos por medio de los cuales un fragmento de retronectina CH-296 refuerza la infección, pueden involucrar la colocalización de partículas retrovirales y de células objetivo⁴³, debido a la propiedad de CH-296 para unirse tanto a la superficie de la célula, a través de su unión con integrinas $\alpha_4\beta_1$, como a la glicoproteína viral, a través de un dominio de heparina II de alta afinidad⁴². Aunque se han propuesto explicaciones alternativas, que involucran la inhibición de la apoptosis y la estimulación de la división celular⁶⁷, nuestros resultados están a favor de los mecanismos anteriores ya que se detectaron efectos diferenciales de CH-296 de acuerdo con el tipo de glicoproteína utilizada para pseudotipado de las partículas de núcleo lentiviral. Las proteínas de la matriz extracelular, tales como los proteoglicanos de sulfato de heparano, juegan un papel principal en las etapas iniciales de infección y quizás son más importantes para mediar la unión viral/célula⁶⁸ que los receptores virales por sí mismos, que sirven principalmente para activar la fusión de la membrana^{69, 70}. Los motivos que influyen diferencialmente el enlazamiento con las proteínas de la matriz extracelular han sido identificados en glicoproteínas de diferentes virus envueltos^{71, 72}. Ellos pueden ser particularmente eficientes en la glicoproteína RD 114 y estimulan la unión a las células mediada por CH-296.

Los vectores del SIV pseudotipados con RD 114/TR transdujeron muy eficientemente a los PVL humanos y de macaco (Fig. 6), en ausencia de retronectina. En realidad, en estas células, existió una notable diferencia en las eficiencias de transducción observadas con los vectores pseudotipados ya sea con la GP VSV-G o de MLV-A y aquellas recubiertas con la GP RD 114/TR. Las razones para esta discrepancia puede yacer en la diferencia en expresión de los receptores para estas GP. Alternativamente, estos resultados pueden no involucrar necesariamente diferencias en la densidad del receptor y/o en los parámetros iniciales de interacción virus/receptor. Varios reportes han mostrado que la eficiencia de la transducción no se relaciona con el nivel de expresión del receptor^{17, 73} sino más bien establecen la importancia de los eventos de posenlazamiento tales como la agrupación del receptor, el mecanismo de fusión de la membrana, el sitio de fusión, el descubrimiento y la migración de la partícula viral desde el sitio de descubrimiento y el núcleo^{74, 75}. Se puede resumir por lo tanto que, para la transducción de las PVL con los vectores del SIV, el receptor de RD 114 modula los eventos de posenlazamiento en una forma más eficiente que los receptores de VSV-G o MLV-A.

Las células se pueden transducir *in vivo* o *in vitro*, dependiendo de la aplicación final. Incluso en el contexto de terapia génica humana, tal como la terapia génica de células madre humanas, se pueden transducir las células madre *in vivo* o, alternativamente, transducir *in vitro* seguido por la infusión de la célula madre transducida en un individuo humano. En un aspecto de esta modalidad, la célula madre humana puede ser removida de un humano, por ejemplo, un paciente humano, utilizando métodos bien conocidos por aquellos capacitados en el arte, y se la puede transducir como se anotó anteriormente. Las células madre transducidas son luego nuevamente introducidas en el mismo individuo humano o en otro diferente.

Cuando un individuo humano es tratado directamente por medio de la introducción del vector en el individuo, se lleva a cabo típicamente el tratamiento por medio de administración intravenosa del vector. Cuando las células, por ejemplo las células CD34⁺, las células dendríticas, las células sanguíneas periféricas o las células tumorales son transducidas *ex vivo*, se incuban las partículas del vector con las células utilizando una dosis generalmente del orden de 1 a 50 multiplicidades de infección (MOI) que también corresponde a 1×10^5 hasta 50×10^5 unidades de transducción del vector viral por 10^5 células. Esto incluye desde luego una cantidad de vector correspondiente a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, y 50 MOI. Típicamente, la cantidad de vector se puede expresar en términos de unidades de transducción HeLa (TU). Otras rutas de administración del vector incluyen una inyección intraarterial, en forma endoscópica, al interior de una lesión, en forma percutánea, subcutánea, intramuscular, intratecal, intraorbital, intradérmica, intraperitoneal, a través de la tráquea, por debajo de la cutícula, dentro del esternón, por inhalación o por nebulización intranasal, por una ruta a través de la tráquea y similares. En modalidades relacionadas con terapias tumorales/contra el cáncer con los vectores de la invención, el vector de expresión se puede suministrar por medio de inyección directa dentro del tumor o dentro de la vasculatura tumoral.

Como se los utiliza aquí, los términos “célula”, “línea celular”, y “cultivo celular” pueden ser utilizados en forma intercambiable. Todos estos términos incluyen también a su progenie, que es cualquiera y todas las generaciones posteriores. Se entiende que toda la progenie puede no ser idéntica debido a mutaciones deliberadas o inadvertidas. En el contexto de la expresión de una secuencia heteróloga de ácido nucleico, “célula huésped” se refiere a una célula procarionota o eucariota, e incluye a cualquier organismo transformable que sea capaz de replicar un vector y/o de expresar a un ácido nucleico heterólogo codificado por los vectores de esta invención. Una célula huésped puede ser utilizada, y lo ha sido, como un receptor para vectores. Una célula huésped puede ser “transfectada” o “transformada”, lo cual se refiere a un proceso por medio del cual se transfiere o se introduce un ácido nucleico exógeno dentro de la célula huésped. Una célula transformada incluye a la célula principal objetivo y a su progenie. Como se los utiliza aquí, los términos células o células huésped “modificadas genéticamente” y “recombinantes” pretenden referirse a una célula dentro de la cual se ha introducido una secuencia exógena de ácido nucleico, tal como, por ejemplo, un lentivector de la invención que soporta una construcción génica terapéutica. Por lo tanto, las células recombinantes son diferentes de las células de ocurrencia natural que no contienen un ácido nucleico introducido en forma recombinante.

En ciertas modalidades, se contempla que las secuencias de ARN o las secuencias proteináceas pueden ser co-expresadas con otras secuencias seleccionadas de ARN o secuencias proteináceas en la misma célula huésped. La coexpresión se puede lograr por medio de cotransfección de la célula huésped con dos o más vectores recombinantes distintos. Alternativamente, se puede construir un vector recombinante individual para incluir múltiples regiones distintas de codificación para los ARN, que podrían ser expresados luego en células huésped transfectadas con el vector individual.

Las células huésped se pueden derivar de procariotas o de eucariotas, dependiendo de si el resultado deseado es la replicación del vector o expresión de una parte o de todas las secuencias de ácido nucleico codificadas por el vector. Numerosas líneas celulares o cultivos se encuentran disponibles para ser utilizados como célula huésped, y se pueden obtener a través de la American Type Culture Collection (ATCC), que es una organización que sirve como archivo para cultivos vivos y materiales genéticos. Algunos ejemplos de células huésped utilizadas en esta invención incluyen, pero no se limitan a, células para empaquetamiento de virus, células productoras de virus, células 293T, células progenitoras hematopoyéticas humanas, células madre hematopoyéticas humanas, células CD34⁺, células CD4⁺, y similares.

Una persona capacitada en el arte comprenderá que la invención no está limitada a ningún tipo de célula particular y que se pueden utilizar los vectores lentivirales y los métodos de la invención para la expresión de transgenes en muchos tipos de células. Algunos ejemplos de tipos de células contempladas incluyen a células terminales diferenciadas tales como neuronas, células pulmonares, células musculares, células de hígado, células pancreáticas, células endoteliales, células cardíacas, células estromales de la médula ósea, células del oído y del ojo. Adicionalmente, también se contempla células madre y células progenitoras tales como células ductales pancreáticas, precursores neurales, y células madre mesodérmicas. Más notablemente, sin embargo, los lentivectores más preferidos de la presente invención tienen características altamente deseables que permiten la expresión de alto nivel de transgenes en células progenitoras humanas en tanto que reúnan los requerimientos humanos de bioseguridad.

Para la producción de partículas de virus, se puede emplear cualquier célula que sea compatible con la expresión de genes lentivirales Gag y Pol, o cualquier célula que pueda ser modificada genéticamente para soportar tal expresión. Por ejemplo, se pueden utilizar células productoras tales como las células 293T, las células TE 671 y las células HT 1080.

Desde luego, como se observó, los lentivectores de la invención serán particularmente útiles en la transducción de una célula progenitora hematopoyética humana o en una célula madre hematopoyética, obtenida ya sea a partir de la médula ósea, de la sangre periférica o de la sangre del cordón umbilical, así como en la transducción de una célula T CD4⁺, una célula linfocítica B o T de sangre periférica, una célula mononuclear de sangre periférica, una célula dendrítica, y una célula monocítica. Los objetivos particularmente preferidos son las células CD34⁺.

Un tejido puede incluir a una célula huésped o a células que van a ser transformadas o puestas en contacto con una composición para suministro de ácido nucleico y/o un agente adicional. El tejido puede ser parte o estar separado de un organismo. En ciertas modalidades, el tejido y sus células constituyentes puede incluir, pero no se limita a, sangre (por ejemplo, células hematopoyéticas (tal como células progenitoras hematopoyéticas humanas, células madre hematopoyéticas humanas, células CD34⁺, células CD4⁺), linfocitos y otras células de linaje sanguíneo), médula ósea, cerebro, células madre, vasos sanguíneos, hígado, pulmón, hueso, seno, cartílago, cérvix, colon, córnea, endometrio, endotelial, epitelial, esófago, facia, fibroblasto, folicular, células ganglionares, células gliales, células caliciformes, riñón, nodo linfático, músculo, neurona, ovarios, páncreas, sangre periférica, próstata, piel, intestino delgado, bazo, estómago, testículos.

En ciertas modalidades, las células huésped o tejido pueden estar incluidos en al menos un organismo. En ciertas modalidades el organismo puede ser humano, de primate o de murido. En otras modalidades el organismo puede ser cualquier eucariota o inclusive un procariota (por ejemplo, una eubacteria, una arquea), como lo comprendería alguien normalmente capacitado en el arte. Algunos lentivectores de la invención pueden emplear secuencias de control que les permiten ser replicados y/o expresados tanto en células procariotas como eucariotas. Alguien capacitado en el arte comprendería adicionalmente las condiciones bajo las cuales incubar todas las células huésped anteriormente descritas para mantenerlas y para permitir la replicación de un vector. También se entienden y se conocen las técnicas y condiciones que permitirían la producción a gran escala de los lentivectores de la invención, así como la producción

de los ácidos nucleicos codificados por los lentivectores y sus polipéptidos afines, proteínas, o péptidos, alguno de los cuales son gene terapéuticos o proteínas que serán utilizados para terapias génicas.

5 C. Composiciones Inyectables y Formulaciones Farmacéuticas

Para lograr una terapia génica utilizando las composiciones lentivirales de la presente invención, se pondría en contacto generalmente a una célula que lo requiriera con un vector lentiviral que incluye un gen terapéutico. La célula estaría además en un organismo tal como un humano que estuviera requiriendo de una terapia génica. Las rutas de administración variarían, naturalmente, con la ubicación y la naturaleza de la enfermedad, e incluyen, por ejemplo, administración intravenosa, intraarterial, intradérmica, transdérmica, intramuscular, intranasal, subcutánea, percutánea, intratraqueal, intraperitoneal, intratumoral, por perfusión y lavado. Las células también serán aisladas algunas veces del organismo, expuestas al lentivector *ex vivo*, y reimplantadas después de eso.

La inyección de construcciones lentivirales de ácido nucleico de la invención se puede suministrar por medio de una jeringa o de cualquier otro método utilizado para inyección de una solución, siempre y cuando la construcción para expresión pueda pasar a través del calibre particular de la aguja requerida para la inyección. Un nuevo sistema de inyección sin aguja ha sido recientemente descrito (patente estadounidense No. 5.846.233) que tiene una boquilla que define una cámara de una ampollita para contener la solución y un dispositivo de energía para empujar la solución fuera de la boquilla hacia el sitio del suministro. También se ha descrito un sistema de jeringa para uso en terapia génica que permite múltiples inyecciones de cantidades predeterminadas de una solución en forma precisa a cualquier profundidad (patente estadounidense No. 5.846.225).

Las soluciones de los ácidos nucleicos como bases libres o como sales farmacológicamente aceptables se pueden preparar en agua mezclada adecuadamente con un tensoactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones se pueden preparar también en glicerol, en polietilén glicoles líquidos, y en mezclas de los mismos y en aceites. Bajo condiciones ordinarias de almacenamiento y de uso, estas preparaciones contienen un preservante para prevenir el crecimiento de microorganismos. Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles, o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones inyectables estériles o dispersiones (patente estadounidense No. 5.466.468). En todos los casos la forma debe ser estéril y debe ser lo suficientemente fluida para que pueda ser fácilmente inyectada. Debe ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe ser preservada contra la acción de la contaminación por parte de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El excipiente puede ser un solvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilén glicol, y polietilén glicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y/o aceites vegetales. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, por medio del uso de un recubrimiento, tal como lecitina, por medio del mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y por medio del uso de tensoactivos. La prevención de la acción de microorganismos se puede lograr por medio de diferentes agentes antibacteriales y antihongos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede lograr por medio del uso en las composiciones de agentes que retrasen la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Para administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución debe ser amortiguada en forma adecuada si es necesario y el diluyente líquido se vuelve primero isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para administración intravenosa, intraarterial, intramuscular, subcutánea, intratumoral e intraperitoneal. En este sentido, el medio acuoso estéril que puede ser empleado será conocido por aquellos capacitados en el arte a la luz de la presente descripción. Por ejemplo, se puede disolver una dosis en 1 ml de una solución isotónica de NaCl y se añade ya sea a 1000 ml de un fluido de hipodermoclinis o inyectada en el sitio propuesto para la infusión (ver, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15^{ava} edición, páginas 1035 - 1038 y 1570 - 1580). Necesariamente se presentará alguna variación en la dosis dependiendo de la condición del individuo que está siendo tratado. La persona responsable de la administración, en cualquier caso, determinará la dosis apropiada para el individuo en particular. Además, para administración en humanos, las preparaciones deben reunir los requisitos estándar de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza requeridos por la Oficina de la FDA para estándares Biológicos.

Las soluciones estériles inyectables se preparan incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el solvente apropiado con diferentes otros ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido por esterilización filtrante. Generalmente, se preparan las dispersiones por medio de la incorporación de diferentes ingredientes activos esterilizados dentro de un vehículo estéril que contiene al medio básico de dispersión y a los otros ingredientes requeridos entre aquellos enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones estériles inyectables, los métodos preferidos de preparación son técnicas de secado al vacío y de liofilización que rinden un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución previamente filtrada en forma estéril de la misma.

Las composiciones divulgadas aquí se pueden formular en forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen a las sales de adición ácida y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o ácido fosfórico, o ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido mandélico, y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilos libres se pueden derivar también de bases inorgánicas

tales como, por ejemplo, de sodio, de potasio, de amonio, de calcio, de hidróxidos férricos, y de bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares. Después de la formulación, se administrarán las soluciones en una forma compatible con la formulación de la dosis y en una cantidad tal que sea terapéuticamente efectiva. Se administran fácilmente las formulaciones en una variedad de formas de dosificación tales como soluciones inyectables, cápsulas para liberación del fármaco y similares.

Como se lo utiliza aquí, “excipiente” incluye a cualquiera y a todos los solventes, medios de dispersión, vehículos, recubrimientos, diluyentes, agentes antibacteriales y antihongos, agentes isotónicos y que retrasan la absorción, amortiguadores, soluciones portadoras, suspensiones, coloides, y similares. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticas activas es bien conocido en el arte. Excepto en la medida en que cualquier medio convencional o agente sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones farmacéuticas. Se pueden incorporar también ingredientes activos suplementarios dentro de las composiciones.

La frase “farmacéuticamente aceptable” o “farmacológicamente aceptable” se refiere a entidades moleculares y a composiciones que no producen una reacción alérgica o similar a una reacción desfavorable cuando se las administra a un humano. La preparación de una composición acuosa que contiene una proteína como ingrediente activo es bien entendida en el arte. Típicamente, tales composiciones se preparan como inyectables, ya sea como soluciones líquidas o como suspensiones; se pueden preparar formas sólidas adecuadas para una solución líquida o para una suspensión en líquido antes de una inyección.

Los términos “en contacto con” o “expuesto a”, cuando se los aplica a una célula, son utilizados aquí para describir el proceso por medio del cual un vector lentiviral terapéutico es suministrado a una célula objetivo.

Para terapia génica de tumores accesibles sólidos y discretos, se contempla específicamente una inyección intratumoral, o una inyección dentro de la vasculatura tumoral. La administración local, regional o sistémica también puede ser apropiada. Para tumores > 4 cm, el volumen que se debe administrar será aproximadamente de 4 - 10 ml (preferiblemente 10 ml), mientras que para tumores < 4 cm, se utilizará un volumen de aproximadamente 1 - 3 ml (preferiblemente 3 ml). Las inyecciones múltiples suministradas como una dosis única incluyen aproximadamente volúmenes desde 0,1 hasta aproximadamente 0,5 ml. Las partículas virales se pueden poner en contacto convenientemente por medio de la administración de inyecciones múltiples en el tumor, espaciadas aproximadamente a intervalos de 1 cm. Se prefiere la administración sistémica para condiciones tales como neoplasias hematológicas.

También se puede hacer una administración continua cuando sea conveniente. Se prefiere el suministro a través de una jeringa o de cateterismo. Tal perfusión continua puede tener lugar durante un período aproximadamente de 1 - 2 horas, hasta aproximadamente 2 - 6 horas, hasta aproximadamente 6 - 12 horas, hasta aproximadamente 12 - 24 horas, hasta aproximadamente 1 - 2 días, hasta aproximadamente 1 - 2 semanas o más después de la iniciación del tratamiento. Generalmente, la dosis de la composición terapéutica a través de perfusión continua será equivalente a aquella suministrada por inyecciones únicas o múltiples, ajustadas durante un periodo de tiempo durante el cual ocurre la perfusión.

Los regímenes de tratamiento pueden variar también, y a menudo dependen del tipo de enfermedad y de la localización del tejido enfermo, y de factores tales como la salud y la edad del paciente. El médico estará mejor capacitado para tomar tales decisiones con base en el conocimiento sobre la eficacia y la toxicidad (si la hay) de las formulaciones terapéuticas con base en los vectores lentivirales de la presente invención.

Los tratamientos pueden incluir diferentes “dosis unitarias”. Una dosis unitaria se define como aquella dosis que contiene una cantidad predeterminada de la composición terapéutica que incluye un vector lentiviral de la presente invención. La cantidad que se va a administrar, y la ruta particular y la formulación, están dentro de los conocimientos de aquellos capacitados en las ciencias médicas. Una dosis unitaria no necesita ser administrada como una inyección única sino que puede incluir una infusión continua durante un período de tiempo establecido. La dosis unitaria de la presente invención puede ser descrita convenientemente en términos de unidades de transducción (T. U.) del lentivector, como se define por medio de la titulación del vector sobre una línea de células tales como HeLa ó 293. Las dosis unitarias están en el rango de 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} T. U. y superiores.

8. Ácidos Nucleicos

A. Transgenes y tratamientos para enfermedades

Una modalidad de la presente es transferir ácidos nucleicos que codifican un gen terapéutico, especialmente un gen que proporciona terapia para trastornos hematopoyéticos y linfo-hematopoyéticos tales como los trastornos heredados o adquiridos descritos anteriormente. En una modalidad, los ácidos nucleicos codifican una forma de longitud total, sustancialmente de longitud total o equivalente funcional de tal gen. Estos genes se pueden conocer como transgenes.

Se cree que los lentivectores de la presente invención se pueden emplear para suministrar cualquier transgén que uno desee, dependiendo de la aplicación. En el caso del suministro a células progenitoras hematopoyéticas, uno seleccionará típicamente un transgén que confiera una función deseable sobre tales células, incluyendo, por ejemplo, genes

para la globina, factores de crecimiento hematopoyéticos que incluyen eritropoyetina (EPO), las interleuquinas (tales como la interleuquina-1 (IL-1), interleuquina-2 (IL-2), interleuquina-3 (IL-3), interleuquina-6 (IL-6), interleuquina-12 (IL-12), etc.) y los factores estimuladores de colonias (tal como el factor estimulador de granulocitos, el factor estimulador de colonias de granulocitos/macrófagos, o el factor estimulador de colonias de células madre), la integrina $\alpha\text{IIB}\beta$ específica de las plaquetas, genes resistentes a múltiples drogas, los genes gp91 o gp47 que son deficientes en pacientes con enfermedad granulomatosa crónica (CGD), genes antivirales que vuelven a las células resistentes a las infecciones con patógenos tales como el virus de inmunodeficiencia humana, genes que codifican para los factores de coagulación sanguínea VIII o IX que están mutados en hemofílicos, ligandos involucrados en respuestas inmunes mediadas por células T tales como los receptores del antígeno de células T, receptores del antígeno de células B (inmunoglobulinas), la cadena γ común en el receptor de interleuquina, así como combinación de receptores del antígeno de células T y B solos o en combinación con anticuerpos de cadena sencilla tales como ScFv, el factor de necrosis tumoral (TNF), IL-2, IL-12, interferón gama, CTLA4, B7 y similares, los genes expresados en células tumorales tales como Melana, genes MAGE (tales como MAGE-1, MAGE-3), P198, P1A, gyp100, etc.

Una aplicación principal de la presente invención será suministrada por los vectores que suministran transgenes deseados para células hematopoyéticas por una cantidad de razones posibles. Esto podría incluir, pero desde luego no está limitado a, el tratamiento de mielosupresión y neutropenias que pueden ser causadas como resultado de quimioterapia o terapia inmunosupresora de infecciones tales como SIDA, trastornos genéticos, cánceres y similares.

Los ejemplos de trastornos genéticos de células hematopoyéticas que están contempladas incluyen anemia de células falciformes, talasemias, hemoglobinopatías, trombostenia de Glanzmann, trastornos por almacenamiento lisosomal (tales como la enfermedad de Fabry, la enfermedad de Gaucher, la enfermedad de Niemann-Pick, y el síndrome de Wiskott-Aldrich), síndromes de inmunodeficiencia combinada severa (SCID), así como enfermedades resultantes de la carencia de producción sistémica de una proteína segregada, por ejemplo el factor de coagulación VIII y/o IX. En tales casos uno desearía introducir transgenes tales como los genes para la globina, factores de crecimiento hematopoyéticos, que incluyen eritropoyetina (EPO), las interleuquinas (especialmente la interleuquina-1, interleuquina-2, interleuquina-3, interleuquina-6, interleuquina-12, etc.) y los factores estimuladores de colonias (tal como el factor estimulador de colonias de granulocitos, el factor estimulador de colonias de granulocitos/macrófagos, o el factor estimulador de colonias de células madre), la integrina $\alpha\text{IIB}\beta$ específica de las plaquetas, genes resistentes a múltiples drogas, los genes gp91 o gp47 que son deficientes en pacientes con enfermedad granulomatosa crónica (CGD), genes antivirales que vuelven a las células resistentes a las infecciones con patógenos tales como el virus de inmunodeficiencia humana, genes que codifican para los factores de coagulación sanguínea VIII o IX que están mutados en hemofílicos, ligandos involucrados en respuestas inmunes mediadas por células T tales como los receptores del antígeno de células T, receptores del antígeno de células B (inmunoglobulinas), la cadena γ común en el receptor de interleuquina, así como combinación de receptores del antígeno de células T y B solos o en combinación con anticuerpos de cadena sencilla (ScFv), IL-2, IL-12, TNF, interferón gama, CTLA4, B7 y similares, los genes expresados en células tumorales tales como Melana, genes MAGE (tales como MAGE-1, MAGE-3), P198, P1A, gyp100, etc.

Los ejemplos de cánceres son aquellos de origen hematopoyético, por ejemplo, que surgen de linajes mieloides, linfoides o eritroides, o células precursoras de los mismos. Los ejemplos de trastornos mieloides incluyen, pero no se limitan a, leucemia promielocítica aguda (APML), leucemia mielógena aguda (AML) y leucemia mielógena crónica (CML). Las neoplasias linfoides que pueden ser tratadas utilizando los lentivectores de la presente invención incluyen, pero no se limitan a leucemia linfoblástica aguda (ALL) que incluye a la ALL de linaje B y a la ALL de linaje T, leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia prolinfocítica (PLL), leucemia de células pilosas (HLL) y macroglobulinemia de Waldenstrom (WM). Las formas adicionales de linfomas malignos contempladas como candidatas para tratamiento utilizando los vectores lentivirales de la presente invención incluyen, pero no se limitan a linfoma que no es de Hodgkin y variantes de mismo, linfomas periféricos de células T, linfoma/leucemia de células T adultas (ATL), linfoma cutáneo de células T (CTCL), leucemia de linfocitos grandes granulares (LGL) y enfermedad de Hodgkin.

De este modo, en algunas modalidades de la presente invención, el tratamiento de un trastorno hematopoyético y linfo-hematopoyético involucra la administración de un vector lentiviral de la invención que incluye una construcción terapéutica para la expresión de ácido nucleico para una célula de origen hematopoyético. El uso de un vector lentiviral de la invención incluye una construcción terapéutica para la expresión de ácido nucleico para la fabricación de un medicamento concebido para el tratamiento de un trastorno hematopoyético y linfo-hematopoyético, está también dentro del alcance de la invención. Se contempla que las células hematopoyéticas incluyan la construcción y expresen al polipéptido terapéutico codificado por el ácido nucleico, restableciendo por lo tanto el fenotipo normal de las células.

Se puede elaborar un ácido nucleico por medio de cualquier técnica conocida por alguien normalmente capacitado en el arte. Los ejemplos no limitantes de ácido nucleico sintético, particularmente un oligonucleótido sintético, incluyen un ácido nucleico elaborado por medio de síntesis química *in vitro* utilizando química de fosforotriéster, de fosfito o de fosforamidita y técnicas en fase sólida tal como se describe en EP 266.032, o a través de intermediarios del desoxinucleósido H-fosfonato como lo describen Froehler y colaboradores, 1986, y la patente estadounidense con serial No. 5.705.629. Un ejemplo no limitante de ácido nucleico producido enzimáticamente incluye uno producido por enzimas en reacciones de amplificación tales como PCRTM (ver, por ejemplo, la patente estadounidense No. 4.683.202 y la patente estadounidense No. 4.682.195) o la síntesis de oligonucleótidos descrita en la patente estadounidense No. 5.645.897. Un ejemplo no limitante de ácido nucleico producido biológicamente incluye la producción de ácido nucleico recombinante en células vivas (ver, por ejemplo, Sambrook y colaboradores, 2000).

Se puede purificar un ácido nucleico sobre geles de poliacrilamida, gradientes de centrifugación de cloruro de cesio, o por cualquier otro medio conocido por alguien ordinariamente capacitado en el arte (ver, por ejemplo, Sambrook y colaboradores, 2000).

El término “ácido nucleico” generalmente se referirá al menos a una molécula o a una hebra de ADN, de ARN o a un derivado o imitación de los mismos, que comprende al menos una nucleobase, tal como, por ejemplo, una base de purina o de pirimidina de ocurrencia natural encontradas en ADN (por ejemplo, adenina “A”, guanina “G”, timina “T”, y citosina “C”) o ARN (por ejemplo, A, G, uracilo “U”, y C). El término “ácido nucleico” abarca los términos “oligonucleótido” y “polinucleótido”. El término “oligonucleótido” se refiere al menos a una molécula aproximadamente entre 3 y aproximadamente 100 nucleótidos de longitud. El término “polinucleótido” se refiere al menos a una molécula al menos aproximadamente de 100 nucleobases de longitud. Estas definiciones generalmente se refieren a al menos una molécula monocatenaria, pero en modalidades específicas abarcará también al menos una hebra adicional que es parcialmente, sustancialmente o totalmente complementaria con al menos una molécula monocatenaria. De este modo, un ácido nucleico puede abarcar al menos a una molécula bicatenaria o al menos a una molécula tricatenaria que comprende a una o más hebra(s) complementaria(s) o “complemento(s)” de una secuencia particular que incluye una hebra de la molécula.

En ciertas modalidades, un “gen” se refiere a un ácido nucleico que es transcrito. Como se lo utiliza aquí, un “segmento de gen” es un segmento de ácido nucleico de un gen. En ciertos aspectos, el gen incluye secuencias reguladoras involucradas en la transcripción, o producción o composición de un mensaje. En modalidades particulares, el gen comprende secuencias transcritas que codifican una proteína, polipéptido o péptido. En otros aspectos particulares, el gen comprende un ácido nucleico, y/o codifica un polipéptido o secuencias codificadoras de péptido de un gen que es defectuoso o está mutado en un trastorno hematopoyético y linfo-hematopoyético. En consonancia con la terminología descrita aquí, un “gen aislado” puede incluir un ácido(s) nucleico(s) transcrito(s), secuencias reguladoras, secuencias codificadoras, o similares, aisladas sustancialmente de otras de tales secuencias, tal como otros genes de ocurrencia natural, secuencias reguladoras, secuencias codificadoras de polipéptidos o de péptidos, etc. En este sentido, el término “gen” es utilizado por simplicidad para referirse a un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que es transcrita y al complemento de la misma. En aspectos particulares, la secuencia transcrita de nucleótidos incluye al menos una unidad funcional que codifica una proteína, polipéptido y/o péptido. Como lo entenderán aquellos versados en el arte, este término funcional “gen” incluye tanto secuencias genómicas, secuencias de ARN o de ADNc, o segmentos más pequeños de ácido nucleico modificado genéticamente, que incluyen segmentos de ácido nucleico de una parte no transcrita de un gen, incluyendo pero sin limitarse a las regiones promotoras o reforzadoras no transcritas de un gen. Los segmentos más pequeños de ácido nucleico de un gen modificado genéticamente pueden expresar, o se pueden adaptar para que expresen, utilizando tecnología para manipulación de ácido nucleico, proteínas, polipéptidos, dominios, péptidos, proteínas de fusión, mutantes y/o similares. Por lo tanto, un “gen truncado” se refiere a una secuencia de ácido nucleico que pierde un tramo de residuos contiguos de ácido nucleico.

Se pueden diseñar diferentes segmentos de ácido nucleico con base en una secuencia particular de ácido nucleico, y puede ser de cualquier longitud. Por medio de la asignación de valores numéricos a una secuencia, por ejemplo, el primer residuo es 1, el segundo residuo es 2, etc., se puede crear un algoritmo que define a todos los segmentos de ácido nucleico:

$$n \text{ hasta } n + y$$

en donde n es un entero de 1 hasta el último número de la secuencia y y es la longitud del segmento de ácido nucleico menos uno, en donde n + y no excede al último número de la secuencia. De este modo, para un intervalo de 10 mer, los segmentos de ácido nucleico corresponden a las bases 1 hasta 10, 2 hasta 11, 3 hasta 12...y/o así sucesivamente. Para un intervalo de 15 mer, los segmentos de ácido nucleico corresponden a las bases 1 a 15, 2 a 16, 3 a 17...y/o así sucesivamente. Para un intervalo de 20 mer, los segmentos nucleicos corresponden a las bases 1 a 20, 2 a 21, 3 a 22...y/o así sucesivamente.

El(los) ácido(s) nucleico(s) de la presente invención, independientemente de la longitud misma de la secuencia, se puede(n) combinar con otras secuencias de ácido nucleico, incluyendo pero sin limitarse a, promotores, reforzadores, señales de poliadenilación, sitios para enzimas de restricción, sitios de clonación múltiple, segmentos de codificación, y similares, para crear una o más construcción(es) de ácido nucleico. De este modo, se puede emplear un segmento de ácido nucleico de casi cualquier longitud, estando preferiblemente limitada la longitud total por la facilidad de preparación o el uso en el pretendido protocolo de ácido nucleico recombinante.

El término “vector” es utilizado para referirse a una molécula portadora de ácido nucleico dentro de la cual se puede insertar una secuencia de ácido nucleico para introducción dentro de una célula donde puede ser replicada. Los vectores de la presente invención son lentivirus basados en la descripción anterior y en otras partes de las especificaciones. Las moléculas de ácido nucleico transportadas por los vectores de la invención codifican genes terapéuticos y serán utilizadas para llevar a cabo terapias génicas. Alguien capacitado en el arte estaría bien equipado para construir tales vectores terapéuticos a través de técnicas recombinantes estándar (ver, por ejemplo, Maniatis y colaboradores, 1988 y Ausubel y colaboradores, 1994).

El término “vector de expresión” se refiere a cualquier tipo de construcción genética que incluye un ácido nucleico que codifica para un ARN capaz de ser transcrito. En algunos casos, se traducen luego las moléculas de ARN en una proteína, polipéptido, o péptido. En otros casos, estas secuencias no son traducidas, por ejemplo, en la producción de moléculas antisentido o ribozimas. Los vectores de expresión pueden contener una variedad de “secuencias de control”, que se refieren a secuencias de ácido nucleico necesarias para la transcripción y posiblemente la traducción de una secuencia de codificación operativamente enlazada en una célula huésped particular. Además de las secuencias de control que gobiernan la transcripción y la traducción, los vectores y los vectores de expresión pueden contener secuencias de ácido nucleico que sirven también otras funciones y son descritas más adelante.

B. Sitios de Clonación Múltiple

Los vectores de la presente invención pueden incluir un sitio de clonación múltiple (MCS), que es una región de ácido nucleico que contiene sitios múltiples para las enzimas de restricción, cualquiera de las cuales puede ser utilizada junto con tecnología recombinante estándar para digerir al vector (ver, por ejemplo, Carbonelli y colaboradores, 1999, Levenson y colaboradores, 1998, y Cocea, 1997). “Digestión con la enzima de restricción” se refiere a escisión catalítica de una molécula de ácido nucleico con una enzima que funciona únicamente en localizaciones específicas en una molécula de ácido nucleico. Muchas de estas enzimas de restricción se encuentran comercialmente disponibles. El uso de tales enzimas está ampliamente comprendido por aquellos capacitados en el arte. Frecuentemente, se linealiza o se fragmenta un vector utilizando una enzima de restricción que corta dentro del MCS para permitir que secuencias exógenas se ligan al vector. “Ligación” se refiere al proceso de formar enlaces fosfodiéster entre dos fragmentos de ácido nucleico, que pueden o no ser contiguos entre sí. Las técnicas que involucran enzimas de restricción y reacciones de ligación son bien conocidas por aquellos capacitados en el arte de la tecnología recombinante.

C. Sitios de Empalme

Las moléculas más transcritas de ARN de eucariotas sufrirán empalme de ARN para remover intrones de los transcritos primarios. Los vectores que contienen secuencias genómicas de eucariotas pueden requerir de sitios de empalme donadores y/o aceptores para garantizar un procesamiento apropiado del transcrito para expresión de la proteína (ver, por ejemplo, Chandler y colaboradores, 1997).

D. Señales de Terminación

Los vectores o construcciones de la presente invención incluirán generalmente al menos una señal de terminación. Una “señal de terminación” o “terminador” está compuesta de las secuencias de ADN involucradas en la terminación específica de un transcrito de ARN por medio de una ARN polimerasa. De este modo, en ciertas modalidades se contempla una señal de terminación que finaliza la producción de un transcrito de ARN. Puede ser necesario un terminador *in vivo* para lograr niveles deseables de mensaje.

En sistemas eucariotas, la región terminadora puede incluir también secuencias específicas de ADN que permiten una escisión específica en el sitio del nuevo transcrito para exponer un sitio de poliadenilación. Estas señalan a una polimerasa endógena especializada para que añada un tramo de aproximadamente 200 residuos de A (poliA) al extremo 3' del transcrito. Las moléculas de ARN modificadas con esta cola de poliA parecen más estables y son traducidas más eficientemente. De este modo, en otras modalidades que involucran eucariotas, se prefiere que el terminador incluya una señal para la escisión del ARN, y se prefiere más que la señal terminadora promueva la poliadenilación del mensaje. El terminador y/o los elementos del sitio de poliadenilación pueden servir para reforzar los niveles del mensaje y para minimizar la lectura a través del casete dentro de otras secuencias.

Los terminadores contemplados para ser utilizados en la invención incluyen a cualquier terminador conocido de la transcripción descrita aquí o conocida por alguien ordinariamente capacitado en el arte, incluyendo, pero sin limitarse a, por ejemplo, las secuencias de terminación de genes, tal como por ejemplo el terminador de la hormona de crecimiento bovino o las secuencias de terminación virales, tales como por ejemplo el terminador SV40. En ciertas modalidades, la señal de terminación puede ser la carencia de una secuencia transcribible o traducible, tal como la debida a un truncamiento de la secuencia.

E. Señales de Poliadenilación

En la expresión génica de eucariotas, se incluirá típicamente una señal de poliadenilación para efectuar la poliadenilación apropiada del transcrito. La naturaleza de la señal de poliadenilación no se cree que sea crucial para la práctica exitosa de la invención, y se puede emplear cualquiera de tales secuencias. Algunos ejemplos incluyen a la señal de poliadenilación de SV40 o a la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovino, convenientes y que se sabe que funcionan bien en diferentes células objetivo. La poliadenilación puede incrementar la estabilidad del transcrito o puede facilitar el transporte citoplasmático.

F. Orígenes de Replicación

Con el propósito de propagar un vector de la invención en una célula huésped, puede contener uno o más orígenes de los sitios de replicación (a menudo llamados “ori”), que es una secuencia específica de ácido nucleico en la cual se inicia la replicación. Alternativamente, se pueden emplear secuencias autónomas de replicación (ARS) si la célula huésped es de levadura.

G. Marcadores para Selección y para Identificación

En ciertas modalidades de la invención, las células transducidas con los lentivectores de la presente invención pueden ser identificadas *in vitro* o *in vivo* por medio de la inclusión de un marcador en el vector de expresión. Tales marcadores conferirían un cambio identificable a la célula transducida permitiendo la fácil identificación de las células que contienen al vector de expresión. Generalmente, un marcador para selección es uno que confiere una propiedad que permite la selección. Un marcador positivo para selección es uno en el cual la presencia del marcador permite su selección, mientras que un marcador negativo para selección es uno en el cual su presencia evita su selección. Un ejemplo de un marcador positivo para selección es un marcador resistente a un fármaco.

Usualmente, la inclusión de un marcador para selección de un fármaco ayuda en la clonación e identificación de transformantes, por ejemplo, construcciones genéticas que confieren resistencia a la neomicina, la puomicina, la higromicina, DHFR, GPT, la Zeocina y el histidinol son marcadores útiles para selección. Además de los marcadores que confieren un fenotipo que permite la discriminación de los transformantes con base en la implementación de condiciones, se contemplan también otros tipos de marcadores incluidos los marcadores para identificación tal como GFP, que se basan en análisis colorimétrico. Alternativamente, se pueden utilizar enzimas para identificación tales como la timidina quinasa del virus del herpes simple (*tk*) o la cloramfenicol acetiltransferasa (CAT). Alguien capacitado en el arte sabría también como emplear marcadores inmunológicos, posiblemente junto con análisis FACS. No se cree que el marcador utilizado sea importante siempre y cuando sea capaz de ser expresado simultáneamente con el ácido nucleico que codifica a un producto génico. Ejemplos adicionales de marcadores para selección y para identificación son bien conocidos por aquella persona capacitada en el arte.

9. Promotores y Reforzadores

Un “promotor” es una secuencia de control que es una región de una secuencia de ácido nucleico en la que la iniciación y la velocidad de la transcripción están controladas. Puede contener elementos genéticos en los que las proteínas y moléculas reguladoras pueden enlazarse, tales como la ARN polimerasa y otros factores de transcripción, para iniciar la transcripción específica de una secuencia de ácido nucleico. Las frases “operativamente posicionado”, “operativamente enlazado”, “bajo control”, y “bajo control transcripcional” significan que un promotor está en una ubicación y/o orientación funcional correctas en relación con una secuencia de ácido nucleico para controlar la iniciación y/o expresión transcripcional de esa secuencia.

Un promotor generalmente incluye una secuencia que actúa para posesionar el sitio de inicio para la síntesis de ARN. El ejemplo más conocido de esto es la caja TATA, pero en algunos promotores que carecen de una caja TATA, tales como, por ejemplo, el promotor para el gen de la desoxinucleotidil transferasa terminal de mamífero y el promotor para los genes tardíos de SV40, un elemento discreto que se superpone al mismo sitio de inicio ayuda a fijar el lugar de iniciación. Elementos promotores adicionales regulan la frecuencia de iniciación transcripcional. Típicamente, estos se localizan en la región de 30 - 110 pb secuencia arriba del sitio de partida, aunque se ha mostrado que una cantidad de promotores contienen también elementos funcionales secuencia abajo del sitio de partida. Para enlazar una secuencia de codificación “bajo el control” de un promotor, se posiciona el extremo 5' del sitio de iniciación de la transcripción del marco de lectura transcripcional “secuencia abajo” de (por ejemplo, 3' de) el promotor escogido. El promotor “secuencia arriba” estimula la transcripción del ADN y promueve la expresión del ARN codificado.

El espaciamiento entre los elementos del promotor frecuentemente es flexible, para que la función del promotor se preserve cuando se inviertan o se muevan los elementos entre sí. En el promotor *tk*, el espaciamiento entre los elementos del promotor se puede incrementar hasta en 50 pb antes de que la actividad empiece a declinar. Dependiendo del promotor, parece que elementos funcionales pueden funcionar ya sea en forma cooperativa o independiente para activar la transcripción. Se puede utilizar o no un promotor junto con un “reforzador”, que se refiere a una secuencia reguladora que actúa en forma *cis* involucrada en la activación transcripcional de una secuencia de ácido nucleico.

Un promotor puede ser uno que esté naturalmente asociado con una secuencia de ácido nucleico, como el que se puede obtener por medio del aislamiento de las secuencias no codificadoras 5' localizadas secuencia arriba del segmento de codificación y/o del exón. Tal promotor puede ser denominado como “endógeno”. En forma similar, un reforzador puede ser uno naturalmente asociado con una secuencia de ácido nucleico, localizada ya sea secuencia abajo o secuencia arriba de esa secuencia. Alternativamente, se obtendrían ciertas ventajas posicionando el segmento codificador del ácido nucleico bajo el control de un promotor recombinante o heterólogo, que se refiere a un promotor que no está normalmente asociado con una secuencia de ácido nucleico en su ambiente natural. Un reforzador recombinante o heterólogo se refiere también a un reforzador que no está normalmente asociado con una secuencia de ácido nucleico en su ambiente natural. Tales promotores o reforzadores pueden incluir promotores o reforzadores

de otros genes, y promotores o reforzadores aislados de cualquier otro virus, o célula procariota o eucariota, y promotores o reforzadores que no son de “ocurrencia natural”, esto es, que contienen diferentes elementos de diferentes regiones reguladoras transcripcionales, y/o mutaciones que alteran la expresión. Por ejemplo, los promotores que son más comúnmente utilizados en una construcción de ADN recombinante incluyen a la β -lactamasa (penicilinas), a la lactosa y a los sistemas promotores de triptófano (trp). Además de la producción de secuencias de ácido nucleico de promotores y reforzadores en forma sintética, se pueden producir secuencias utilizando tecnología de amplificación de ácido nucleico y/o clonación recombinante, incluyendo PCRTM, junto con las composiciones divulgadas aquí (ver las patentes estadounidenses Nos. 4.683.202 y 5.928.906). Además, se contemplan también el empleo de secuencias de control que dirigen la transcripción y/o la expresión de secuencias dentro de organelos no nucleares tales como mitocondrias, cloroplastos, y similares. Las secuencias de control que incluyen promotores, reforzadores y otros locus o elementos controladores/moduladores de la transcripción también son denominados como “casetes transcripcionales”.

Naturalmente, será importante emplear un promotor y/o un reforzador que efectivamente dirija la expresión del segmento de ADN en el organelo, tipo de célula, órgano, u organismo escogido para expresión. Aquellos capacitados en el arte de la biología molecular generalmente conocen el uso de promotores, reforzadores y combinaciones de tipos de células para expresión de proteína, (ver, por ejemplo Sambrook y colaboradores, 2000). Los promotores empleados pueden ser constitutivos, específicos del tejido, inducibles, y/o útiles bajo las condiciones apropiadas para dirigir la expresión de alto nivel del segmento de ADN introducido, tal como es conveniente para terapia génica o para aplicaciones tales como la producción a gran escala de proteínas recombinantes y/o péptidos. El promotor puede ser heterólogo o endógeno.

El uso de un sistema de expresión citoplasmático T3, T7 o SP6 es otra posible modalidad. Las células eucariotas pueden soportar transcripción citoplasmática de ciertos promotores bacteriales si se suministra la polimerasa bacteriana apropiada, ya sea como parte del complejo de suministro o como una construcción adicional de expresión genética.

La Tabla 1 enlista ejemplos no limitantes de elementos/promotores que pueden ser empleados, en el contexto de la presente invención, para regular la expresión de un ARN. La Tabla 2 proporciona ejemplos no limitantes de elementos inducibles, que son regiones de una secuencia de ácido nucleico que puede ser activada en respuesta a un estímulo específico.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 1
Promotor y/o Reforzador

Promotor/Reforzador	Referencias
Inmunoglobulina de Cadena Pesada	Banerji y colaboradores, 1983; Gilles y colaboradores, 1983; Grosschedl y colaboradores, 1985; Atchinson y colaboradores, 1986, 1987; Imler y colaboradores, 1987; Weinberger y colaboradores, 1984; Kiledjian y colaboradores, 1988; Porton y colaboradores, 1990
Inmunoglobulina de Cadena Liviana	Queen y colaboradores, 1983; Picard y colaboradores, 1984
Receptor de Células T	Luria y colaboradores, 1987; Winoto y colaboradores, 1989; Redondo y colaboradores, 1990
HLA DQ α y/o DQ β	Sullivan y colaboradores, 1987
β -Interferón	Goodbourn y colaboradores, 1986; Fujita y colaboradores, 1987; Goodbourn y colaboradores, 1988
Interleuquina-2	Greene y colaboradores, 1989
Receptor de Interleuquina-2	Greene y colaboradores, 1989; Lin y colaboradores, 1990
MHC Clase II 5	Koch y colaboradores, 1989
MHC Clase II HLA-Dra	Sherman y colaboradores, 1989
β -acción	Kawamoto y colaboradores, 1988; Ng y colaboradores, 1989
Creatina Quinasa del Músculo (MCK)	Jaynes y colaboradores, 1988; Horlick y colaboradores, 1989; Johnson y colaboradores, 1989
Prealbúmina (Transtiretina)	Costa y colaboradores, 1988
Elastasa I	Omitz y colaboradores, 1987
Metalotioneina (MTII)	Karin y colaboradores, 1987; Culotta y colaboradores, 1989
Colagenasa	Pinkert y colaboradores, 1987; Angel y colaboradores, 1987
Albúmina	Pinkert y colaboradores, 1987; Tronche y colaboradores, 1989, 1990
α -Fetoproteína	Godbout y colaboradores, 1988; Campere y colaboradores, 1989
γ -Globina	Bodine y colaboradores, 1987; Perez-Stable y colaboradores, 1990
β -Globina	Trudel y colaboradores, 1987
c-fos	Cohen y colaboradores, 1987
c-HA-ras	Triesman, 1986; Deschamps y colaboradores, 1985
Insulina	Edlund y colaboradores, 1985
Molécula de Adición de la Célula Neural (NCAM)	Hirsh y colaboradores, 1990
α 1-Antitripaina	Latimer y colaboradores, 1990
Histona H2B (TH2B)	Hwang y colaboradores, 1990

(Continuación)

TABLA 1	
Promotor y/o Reforzador	
Promotor/Reforzador	Referencias
Colágeno Tipo I y/o de Ratón	Ripe y colaboradores, 1989
Proteína Reguladas por Glucosa (GRP94 y GRP78)	Chang y colaboradores, 1989
Hormona de Crecimiento de Rata	Larsen y colaboradores, 1986
Amiloide A de Suero Humano (SAA)	Edbrooke y colaboradores, 1989
Troponina I (TN I)	Yutzey y colaboradores, 1989
Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF)	Pech y colaboradores, 1989
Distrofia Muscula de Duchenne	Klamut y colaboradores, 1990
SV40	Banerji y colaboradores, 1981; Moreau y colaboradores, 1981; Sleigh y colaboradores, 1985; Firak y colaboradores, 1986; Herr y colaboradores, 1986; Imbra y colaboradores, 1986; Kadesch y colaboradores, 1986; Wang y colaboradores, 1986; Ondek y colaboradores, 1987; Kuhl y colaboradores, 1987; Schaffner y colaboradores, 1988
Polioma	Swartzendruber y colaboradores, 1975; Vasseur y colaboradores, 1980; Katinka y colaboradores, 1980, 1981; Tyndell y colaboradores, 1981; Dandolo y colaboradores, 1983; de Villiers y colaboradores, 1984; Hen y colaboradores, 1986; Satake y colaboradores, 1988; Campbell y/o Villarreal, 1988
Retrovirus	Kriegler y colaboradores, 1982, 1983; Levinson y colaboradores, 1982; Kriegler y colaboradores, 1983, 1984a, b, 1988; Bosze y colaboradores, 1986; Miksicek y colaboradores, 1986; Celander y colaboradores, 1987; Thiesen y colaboradores, 1988; Celander y colaboradores, 1988; Chol y colaboradores, 1988; Reisman y colaboradores, 1989
Virus de Papiloma	Campoy colaboradores, 1983; Lusky y colaboradores, 1983; Spandidos y/o Wilkie, 1983; Spalholz y colaboradores, 1985; Lusky y colaboradores, 1986; Cripe y colaboradores, 1987; Gloss y colaboradores, 1987; Hirochika y colaboradores, 1987; Stephens y colaboradores, 1987
Virus de Hepatitis B	Bulla y colaboradores, 1986; Jameel y colaboradores, 1986; Shaul y colaboradores, 1987; Spandau y colaboradores, 1988; Vannice y colaboradores, 1988

ES 2 326 217 T3

(Continuación)

TABLA 1 Promotor y/o Reforzador	
Promotor/Reforzador	Referencias
Virus de Inmunodeficiencia Humana	<i>Muesing y colaboradores, 1987; Hauber y colaboradores, 1988; Jakobovits y colaboradores, 1988; Feng y colaboradores, 1988; Takebe y colaboradores, 1988; Rosen y colaboradores, 1988; Berkhout y colaboradores, 1989; Laspia y colaboradores, 1989; Sharp y colaboradores, 1989; Braddock y colaboradores, 1989</i>
CD11b	<i>Hickstein y colaboradores, 1992</i>
Virus de Leucemia de Mono Gibón	<i>Holbrook y colaboradores, 1987; Quinn y colaboradores, 1989</i>

TABLA 2 Elementos Inducibles		
Elemento	Inductor	Referencias
MT II	Metales Pesados de Forbol Éster (TFA)	<i>Palmiter y colaboradores, 1982; Haslinger y colaboradores, 1985; Searle y colaboradores, 1985; Stuart y colaboradores, 1985; Imagaway colaboradores, 1987, Karin y colaboradores, 1987; Angel y colaboradores, 1987b; McNeill y colaboradores, 1989</i>
MMTV (virus de tumor mamario de ratón)	Glucocorticoides	<i>Huang y colaboradores, 1981; Lee y colaboradores, 1981; Majors y colaboradores, 1983; Chandler y colaboradores, 1983; Lee y colaboradores, 1984; Ponta y colaboradores, 1985; Sakai y colaboradores, 1988</i>
β-interferón	Poli(rl)x Poli(rc)	<i>Tavernier y colaboradores, 1983</i>
Adenovirus 5 E2	E1A	<i>Imperiale y colaboradores, 1984</i>
Colagenasa	Forbol Éster (TPA)	<i>Angel y colaboradores, 1987a</i>
Estromelisina	Forbol Éster (TPA)	<i>Angel y colaboradores, 1987b</i>
SV40	Forbol Éster (TPA)	<i>Angel y colaboradores, 1987b</i>
Gen MX de Múrido	Interferón, Virus de la Enfermedad de Newcastle	<i>Hug y colaboradores, 1988</i>
Gen GRP78	A23187	<i>Resendez y colaboradores, 1988</i>
α-2-Macroglobulina	IL-6	<i>Kunz y colaboradores, 1989</i>
Vimentina	Suero	<i>Rittling y colaboradores, 1989</i>
Gen H-2κb Clase I de MHC	Interferón	<i>Blonar y colaboradores, 1989</i>
HSP70	E1A, Antígeno T Largo de SV40	<i>Taylor y colaboradores, 1989, 1990a, 1990b</i>
Proliferina	Forbol Éster-TPA	<i>Mordacq y colaboradores, 1989</i>

(Continuación)

TABLA 2 Elementos Inducibles		
Elemento	Inductor	Referencias
Factor de Necrosis Tumoral	PMA	Hensel y colaboradores, 1989
Gen que codifica para la Hormona α Estimuladora de la Tiroides	Hormona de La Tiroides	Chatterjee y colaboradores, 1989

La identidad de los promotores o elementos específicos del tejido, así como los ensayos para caracterizar su actividad, es bien conocida por aquellos capacitados en el arte. Los ejemplos no limitantes de tales regiones incluyen al gen LIMK2 humano (Nomoto y colaboradores, 1999), al gen del receptor 2 de somatostatina (Kraus y colaboradores, 1998), al gen para enlazamiento de ácido retinóico epididimal de múrido (Lareyre y colaboradores, 1999), CD4 humana (Zhao-Emonet y colaboradores, 1998), alfa 2 de ratón (XI) colágeno (Tsumaki, y colaboradores, 1998), al gen del receptor de dopamina D1A (Lee, y colaboradores, 1997), al factor de crecimiento II tipo insulina (1997), y a la molécula 1 de adhesión celular endotelial plaquetaria humana (Almendro y colaboradores, 1996).

Los vectores lentivirales de la presente invención se diseñan, principalmente, para transformar células con un gen terapéutico bajo el control de promotores eucariotas regulados. Aunque se prefiere al promotor gp91-phox, se puede utilizar también a otro promotor y elementos reguladores de la señal como se describe en las Tablas 1 y 2 anteriores. Adicionalmente, se podría utilizar también cualquier combinación promotor/reforzador (como los de la Base de Datos del Promotor Eucariota, EPDB) para conducir la expresión de genes estructurales que codifican al gen terapéutico de interés que se utiliza en contexto con los vectores lentivirales de la presente invención. Alternativamente, se puede emplear un promotor específico del tejido para la terapia génica del cáncer o el reconocimiento de tumores con los vectores lentivirales de la presente invención para el tratamiento de cánceres, especialmente de cánceres hematológicos.

Típicamente, los promotores y reforzadores que controlan la transcripción de genes que codifican proteína en células eucariotas están compuestos de múltiples elementos genéticos. La maquinaria celular es capaz de reunir e integrar la información reguladora transportada por cada elemento, permitiendo que genes diferentes evolucionen de manera diferente, a menudo patrones complejos de regulación transcripcional. La activación o represión de los elementos promotores y reforzadores podría hacerse a través del contacto de esos elementos con los activadores o represores transcripcionales apropiados, tal como aquellos descritos en la Fig. 1B para el promotor gp91-phox y divulgado en Luo y Skalnik (1996) J. Biol. Chem. 271: 18203 - 210, y en Luo y Skalnik (1996) J. Biol. Chem. 271: 23445 - 23451. Con respecto al promotor gp91-phox, la actividad del interferón gama en la modulación de la transcripción y de la expresión del casete de expresión es un ejemplo de cómo se pueden emplear tales elementos promotores o reforzadores y los factores que interactúan con ellos en la práctica de la presente invención.

Originalmente se detectaron los reforzadores como elementos genéticos que incrementaron la transcripción de un promotor localizado en una posición distante sobre la misma molécula de ADN. Esta habilidad para actuar a larga distancia tuvo pocos precedentes en estudios clásicos de regulación transcripcional procariota. Un trabajo posterior mostró que las regiones de ADN con actividad reforzadora están organizadas como promotoras. Esto es, están compuestas de muchos elementos individuales, cada uno de los cuales se enlaza a una o más proteínas transcripcionales. Ver, por ejemplo, el modelo para la regulación del promotor gp91-phox presentado en la Fig. 1B. Los ejemplos de reforzadores contemplados en la presente invención son los elementos Híper Sensibles de ADNasa y sus homólogos descritos por Lien LL, Lee Y, Orkin SH, (1997) "Regulation of the myeloid-cell-expressed human gp91-phox gene as studied by transfer of yeast artificial chromosome clones into embryonic stem cells: suppression of a variegated cellular pattern of expression requires a full complement of distant cis elements", Mol Cell Biol. 17(4): 2279 - 90. Bajo la influencia de estos elementos reforzadores, puede ser mayor la expresión génica (debido a la actividad reforzadora de HS) y menos heterogénea (debido a la actividad silenciadora de HS).

Los análogos de los elementos HS de gp91-phox son activos en otros sistemas promotores - reforzadores. Ver, por ejemplo, May C, Rivella S, Callegari J, Heller G, Gaensler KM, Luzzatto L, Sadelaín M, (2000) Therapeutic haemoglobin synthesis in beta-thalassaemic mice expressing lentivirus-encoded human beta-globin. Nature 406(6791): 82 - 6, donde se indujeron los elementos análogos HS de beta-globina en un lentivector secuencia arriba del promotor de beta-globina para dirigir la expresión del ADNc de beta-globina.

Los promotores y los reforzadores tienen la misma función general de activación de la transcripción en la célula. Ellos están a menudo superpuestos y contiguos, a menudo parecen tener una organización modular muy similar. Tomadas juntas, estas consideraciones sugieren que los reforzadores y promotores son entidades homólogas y que las proteínas activadoras transcripcionales enlazadas a estas secuencias pueden interactuar con la maquinaria transcripcional celular fundamentalmente en la misma forma. La distinción básica entre reforzadores y promotores es operacional. Una región reforzadora en su conjunto debe ser capaz de estimular la transcripción a distancia; esto no es necesariamente cierto para una región promotora o sus elementos componentes. Por otro lado, un promotor debe tener uno o más elementos que dirijan la iniciación de la síntesis del ARN en un sitio particular y en una orientación particular, mientras que los reforzadores carecen de estas especificidades. Aparte de esta distinción operacional, los reforzadores y los promotores son entidades muy similares. Las construcciones de elementos que controlan la transcripción pueden estar compuestas por lo tanto de diferentes elementos dispuestos de tal forma que proporcionan un medio de control de utilidad y operación mejoradas.

Una señal que puede resultar útil es una señal de poliadenilación (hGH, BGH, SV40). El uso de elementos de los sitios internos de enlazamiento del ribosoma (IRES) es utilizado para crear mensajes multitgén o policistrónicos. Los elementos de IRES son capaces de eludir al modelo de exploración del ribosoma de traducción que depende de la cubierta metilada en 5' y comenzar la traducción en sitios internos (Pelletier y Sonenberg, 1988). Se han descrito los elementos de IRES de dos miembros de la familia del picornavirus (polio y encefalomiocarditis) (Pelletier y Sonenberg, 1988), así como un IRES de un mensaje de mamífero (Macejak y Sarnow, 1991). Los elementos de IRES se pueden enlazar a marcos heterólogos de lectura abierta. Se pueden transcribir juntos marcos múltiples de lectura abierta, cada uno separado por un IRES, creando mensajes policistrónicos. En virtud del elemento del IRES, cada marco de lectura abierta es accesible a los ribosomas para una traducción eficiente. Se pueden expresar eficientemente múltiples genes utilizando un único promotor/reforzador para transcribir un mensaje único.

En cualquier caso, se entenderá que los promotores son elementos de ADN que cuando están posicionados funcionalmente secuencia arriba de un gen conducen a la expresión de ese gen. La mayoría de los transgenes que serán transformados utilizando los vectores lentivirales de la presente invención están funcionalmente posicionados secuencia debajo de un elemento promotor.

También se puede requerir una señal específica de iniciación para una traducción eficiente de las secuencias de codificación. Estas señales incluyen al codón de iniciación ATG o secuencias adyacentes. Puede que sea necesario suministrar las señales exógenas de control de la traducción, que incluyen al codón de iniciación ATG. Alguien normalmente capacitado en el arte sería capaz de determinar fácilmente esto y proporcionaría las señales necesarias. Se sabe bien que el codón de iniciación debe estar "dentro del marco" con el marco de lectura de la secuencia de codificación deseada para garantizar la traducción del inserto completo. Las señales de control exógenas de la traducción y los codones de iniciación pueden ser o bien naturales o sintéticos. La eficiencia de la expresión se puede mejorar por medio de la inclusión de elementos apropiados reforzadores de la transcripción.

10. Breve Descripción de los Listados de Secuencia

SEQ ID NO: 1 proporciona la secuencia de nucleótidos de []

SEQ ID NO: 2 proporciona la secuencia de aminoácidos de []

SEQ ID NO: 3 proporciona la secuencia de nucleótidos de []

SEQ ID NO: 4 proporciona la secuencia de aminoácidos de []

11. Ejemplos

Se incluyen los siguientes ejemplos para demostrar las modalidades preferidas de la invención. Aquellos capacitados en el arte apreciarán que las técnicas descritas en los ejemplos que vienen a continuación representan técnicas descubiertas por el inventor para funcionar bien en la práctica de la invención, y por lo tanto se puede considerar que constituyen formas preferidas de esta práctica.

A. Materiales y Metodología Empleada en los Ejemplos 1 - 10

1. Células

La línea celular 293T de riñón embrionario humano (CRL-1573 de la ATCC) y la línea celular TE671 de rabdomiosarcoma humano (CRL-8805 de la ATCC) fueron cultivadas en DMEM (Life Technologies, France) suplementado con suero fetal de ternera al 10% (FCS).

Se obtuvieron células CD34⁺ de humano y de macaco cinomólogo (*Macaca fascicularis*) a partir de muestras de sangre movilizada y de médula ósea, respectivamente, como se describió previamente²⁶⁻²⁸. Se recuperaron las células

CD34⁺ después de centrifugación por gradiente de Ficoll-Paque (Pharmacia, Suecia) y se las purificó con Dynabeads M450 anti-CD34 (DynaL, Noruega). La pureza de las células CD34⁺ estaba por encima del 95%.

Se separaron las células mononucleares de sangre periférica de macaco cinomólogo y de humano (PBMC) a partir de sangre fresca de donantes sanos utilizando un gradiente de Ficoll-Hypaque/Percoll (Pharmacia, Suecia), como se describió previamente²⁹. Se enriquecieron los linfocitos de sangre periférica (PBL) de la fracción PBMC por medio de adherencia durante la noche a 37°C para remover los monocitos adherentes y se monitoreó la expresión del marcador CD3 (75 - 85% fueron CD3⁺).

2. Anticuerpos

El anti-RD114 GP (ViroMed Biosafety Labs, EUA) era un antisuero de cabra surgido contra la glicoproteína gp70 de la envoltura de RD114 (SU), utilizado en forma diluida hasta 1/5.000 para Transferencias Western. La CA anti-SIV (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, EUA) era un anticuerpo monoclonal de ratón (2F12) surgido contra la proteína de la cápside (CA) de p27 de SIVmac251, que se utilizó diluido hasta 1/500 para Transferencias Western. La CA anti-MLV (ViroMed Biosafety Labs, EUA) era un antisuero de cabra surgido contra la proteína de la cápside (CA) p30 del virus de la leucemia de Rausher (RLV), que se utilizó diluido hasta 1/10.000 para Transferencias Western.

3. Empaquetamiento y construcciones del vector de transferencia

El plásmido de empaquetamiento pSIV-12 (Fig. 1) es un derivado de pSIV825 y expresa a los genes *gag-pol* de SIVmac251 bajo el control del promotor hCMV y una unidad de expresión del gen *rev* del VIH-1 dentro de la cual los dos exones de *rev* han sido fusionados y colocados bajo el control del promotor de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMG), del intrón I de la HMG y de las secuencias de poliadenilación de SV40. El plásmido pSIV-T1³⁰ codifica a un vector con base en SIVmac251 competente para empaquetamiento que expresa al gen marcador para la proteína fluorescente verde mejorada (GFP) bajo el control del promotor CMV (Fig. 1).

El plásmido pSIV-T1⁺ codifica a un vector con base en SIVmac251 competente para empaquetamiento que expresa al gen marcador para la proteína fluorescente verde mejorada (GFP) bajo el control del promotor CMV. El plásmido de empaquetamiento del virus de leucemia de múrdo pTG5349 (MLV) y el plásmido pTG13077, que codifica a un vector con base en el MLV que contiene una unidad transcripcional interna CMV-GFP fueron gentilmente suministrados por Transgene SA (Estrasburgo, Francia).

4. Construcciones para la expresión de glicoproteína viral

Los siguientes plásmidos, phCMV-G³¹, EboV-GP (gentil obsequio de V. Volchkov), phCMV-HA³², phCMV-10A1³³ y phCMV-GALV³³ codifican a la proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV), a la glicoproteína de la cepa Zaire del Virus de Ébola (EboV), a la hemaglutinina H7-HA del virus de la peste de las aves de corral (FPV), a las glicoproteínas de la envoltura del virus de la leucemia del mono Gibón (GALV) y de MLV-10A1, respectivamente. Todas las glucoproteínas fueron expresadas bajo el control de las mismas señales que actúan en forma cis: el promotor CMV, el intrón II de β -globina de conejo y las secuencias de poliadenilación (Fig. 1).

Se utilizó phCMV-G como una columna vertebral para expresar las glicoproteínas derivadas del virus endógeno de felino RD 114 (Genbank X8782934) y la cepa 4070A del MLV anfotrópico (MLV-A³⁵). El vector de expresión phCMV-RD114, que expresa la glicoproteína de la envoltura del virus RD114 (GP RD114), y la construcción phCMV-GALV fueron modificados adicionalmente para expresar las glicoproteínas quiméricas RD114/TR (Fig. 2B) y GALV/TR^{8,13,15} que portan la cola citoplasmática de la GP del MLV-A.

El vector de expresión phCMV-RD, que expresa a la glicoproteína de la envoltura del virus RD114 (GP RD114), fue modificado adicionalmente para generar una serie de mutantes que albergan modificaciones en el dominio transmembrana de la GP RD114 (TMD) y/o de la cola citoplasmática (CT). Todas las construcciones posteriores fueron generadas por medio de mutagénesis dirigida al sitio de oligonucleótidos y mediadas por PCR (los detalles y las secuencias se encuentran disponibles por solicitud) y clonadas en el plásmido phCMV-RD. Las secuencias de aminoácidos de las porciones carboxi-terminales de las GP del RD114 mutante se muestran en la Fig. 7.

5. Ensayos de sincitios

Las células HeLa utilizadas para los ensayos de fusión fueron transfectadas en forma estable ya sea de un gen para la β -galactosidasa (LacZ) bajo el control de la repetición del terminal largo del VIH-1 (LTR), cuya expresión es dependiente de Tat (células HeLaCD4LTRLacZ), o estuvieron expresando constitutivamente a la proteína Tat del VIH-1 (células HeLa-Tat), como se describió previamente (9). Se cuantificó la fusión mediada por la envoltura esencialmente como se describió previamente (9, 16). En este ensayo, se transactiva la expresión dirigida de LTR del VIH-1 de la β -galactosidasa por medio de la proteína Tat por la fusión de las células que expresan la envoltura con células indicadoras

que soportan al receptor. Veinticuatro horas antes de la transfección se sembraron 5×10^4 células HeLaCD4LTRlacZ por placa de doce pozos. Se transfectaron construcciones de expresión de glicoproteína viral dentro de células HeLa descritas anteriormente utilizando un protocolo de transfección de fosfato de calcio (Clontech, Francia) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante utilizando $1 \mu\text{g}$ de plásmido. 24 horas después de la transfección, se cocultivaron 10^5 células HeLa-Tat indicadoras con las células que presentan glicoproteína viral durante 36 a 48 horas. Se midió la fusión célula-célula después de la fijación con glutaraldehído al 0,5% (peso/volumen) en PBS (Solución salina de amortiguador de fosfato), lavada con PBS y coloreada por medio de incubación en solución de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-Gal) como se describió previamente (9, 16). Se hicieron recuentos de los sincitios azules, que indican la fusión entre las células indicadoras presentes en la envoltura y las que contienen Tat, independientemente del número de núcleos por sincitios.

6. Producción de vectores retrovirales

Los vectores pseudotipados derivados del SIV fueron generados como se describió previamente²⁵ por medio de transfección transitoria de células 293T. La construcción del vector pSIV-T1⁺ ($8,1 \mu\text{g}$), la construcción de empaquetamiento pSIV-12 ($8,1 \mu\text{g}$), y la construcción de expresión de la glicoproteína viral ($2,7 \mu\text{g}$) fueron utilizadas para cotransfectar las células 293T sembradas el día antes en placas de 10 cm. Se reemplazó el medio (12 ml/placa) 16 horas después de la transfección, y se recogió el sobrenadante 24 horas más tarde. La concentración de las partículas del vector se llevó a cabo por precipitación de los viriones en tubos de ultracentrifugación de 26 ml, que fueron centrifugados durante una hora a 32.000 rpm a 4°C en un rotor Beckman 70Ti. Se resuspendieron los precipitados virales en DMEM libre de suero suplementado con albúmina de suero bovino al 1% (BSA) en 1/100 del volumen inicial del sobrenadante viral, se formaron alícuotas y se almacenó a -80°C.

Los vectores pseudotipados derivados del MLV fueron generados en una forma similar por medio de transfección transitoria de la construcción de empaquetamiento del MLV pTG5349 ($8,1 \mu\text{g}$), de la construcción del vector del MLV pTG13077 ($8,1 \mu\text{g}$), y de la construcción que expresa a la glicoproteína ($2,7 \mu\text{g}$). Se transfectaron los ADN del plásmido en $2,5 \times 10^6$ células 293T sembradas el día antes en placas de 10 cm utilizando un protocolo de transfección de fosfato de calcio (Clontech, Francia) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Se reemplazó el medio (8 ml/placa) 16 horas después de la transfección, y se recogió el sobrenadante 24 horas más tarde y se filtro a través de membranas con tamaño de poro de $0,45 \mu\text{m}$.

7. Inmunotransferencias e incorporación viral de las glicoproteínas

Se lisaron las células productoras del virus en un amortiguador Tris-HCl 20 mM (pH 6,5) que contenía Triton-X100 al 1%, SDS al 0,05% (Dodecil sulfato de sodio), 5 mg/ml de desoxicolato de sodio, NaCl 150 mM, y PMSF 1 mM. Se incubaron los lisados durante 10 min a 4°C y se centrifugó durante 5 min a $13.000 \times g$ para precipitar los núcleos. Se congelaron luego los sobrenadantes a -80°C hasta análisis posteriores. Se obtuvieron muestras purificadas de virus por medio de ultracentrifugación de los sobrenadantes virales (8 ml) a través de una almohadilla de sacarosa de 1,5 ml al 20% en un Rotor Beckman SW41 (25.000 rpm, 2,5 horas, 4°C). Se suspendieron los precipitados virales en $100 \mu\text{l}$ de PBS, y se congeló a -80°C.

Se mezclaron las muestras ($30 \mu\text{g}$ para los lisados celulares, o $20 \mu\text{l}$ para los virus purificados) en una proporción de 5:1 (vol : vol) en un amortiguador de Tris - HCl 375 mM (pH 6,8) que contenía SDS al 6%, β -mercapto-etanol al 30%, glicerol al 10%, y azul de bromofenol al 0,06%, se ebulló durante 5 min, luego se corrió sobre SDS- PAGE al 9%. Después de la transferencia de la proteína sobre filtros de nitrocelulosa se llevó a cabo una inmunocoloración en TBS (solución salina con base en Tris, pH 7,4) con leche en polvo al 10% y TWEEN al 0,1%. Las transferencias fueron probadas con el anticuerpo relevante y desarrolladas utilizando Ig conjugado con HRPO (inmunoglobulinas) surgidas contra las especies de cada anticuerpo primario (DAKO, RU) y un kit mejorado de quimioluminiscencia (Amersham Life Science).

8. Marcación metabólica e Inmunoprecipitación

Doce horas después de la transfección con los diferentes componentes del vector lentiviral u oncoretroviral, se privó de alimento de alimento a las células productoras de virus en un medio de cultivo libre de metionina y de cisteína durante 1 h y se las marcó a 37°C durante 16 horas en 3 ml de DMEM libre de metionina y de cisteína que contenía $100 \mu\text{Ci}$ de cisteína marcada con ^{35}S y metionina marcada con ^{35}S (ICN) por ml y suero fetal de ternera dializado al 2%. Se lisaron las células y se las inmunoprecipitó como se describió previamente (9) con un suero SU anti - RD 114 de cabra. Para los análisis del procesamiento de la cola citoplasmática de la subunidad de la GP de TM, se recogieron los sobrenadantes de las células productoras del virus y se filtró a través de un filtro con tamaño de poro de $0,45 \mu\text{m}$. Se ultracentrifugaron los sobrenadantes sobre una almohadilla de 2 ml de sacarosa al 20% durante 2 horas a 30.000 rpm en un rotor SW41 (Beckman). Se lisaron los precipitados por medio de la adición de 150 μl de amortiguador de lisis (Tris HCl 50 mM (pH 7,5), NaCl 15 mM, MgCl_2 5 mM KCl 5 mM, Triton X-100 al 1%, desoxicolato de sodio al 0,5%). Se preservó un quinto del lisado y se corrió una electroforesis como tal para un análisis crudo del contenido de proteína del virus por medio de transferencias Western, mientras que el resto del lisado fue enviado a inmunoprecipitación con anticuerpos SU anti - RD 114. Se sometieron a electroforesis los inmunoprecipitados en dodecil sulfato de sodio (SDS) en geles de poliacrilamida al 12% bajo condiciones reductoras para disociar la subunidad de GP coinmunoprecipitada de TM de SU.

9. Ensayos de infección

La determinación de las eficiencias de transducción y títulos infecciosos se llevó a cabo como se detalló previamente²⁵, utilizando TE671 como las células objetivo. Se examinó la estabilidad de los pseudotipos de vectores en sueros humanos o de macaco por medio de titulación de las partículas virales supervivientes después de la incubación en mezclas 1:1 (volumen:volumen) de preparaciones de virus con sueros frescos durante 1 h a 37°C, como se describió previamente³⁶. Se utilizaron aproximadamente 5×10^4 unidades infecciosas de GFP de partículas del vector pseudotipado por punto. Se recogieron los sueros de donantes sanos de sangre y se los acondicionó como se publicó³⁶. Se determinó la estabilidad de los viriones como el porcentaje de infectividad de virus tratados con suero de primate versus los virus tratados con suero fetal de ternera. Se utilizaron sueros inactivados por calor (56°C, 1 h) como controles. Se sembraron células objetivo TE671 con una densidad de 3×10^5 células por pozo en placas de 6 pozos un día antes de la transducción. Se añadieron diluciones seriales de preparaciones de vectores a las células en presencia de 6 µg/ml de polibreno, y se incubaron los cultivos durante 4 h a 37°C. Se reemplazó luego el medio que contenía al vector con medio de cultivo normal y se incubaron las células durante 72 h a 37°C. La eficiencia de la transducción, determinada como el porcentaje de células positivas para la GFP, se midió por medio del análisis FACS después de la individualización de las células transducidas en tripsina y de su resuspensión en PBS. Los títulos infecciosos, suministrados como unidades infecciosas (i.u.)/ml, fueron calculados por medio del uso de la fórmula: Título = % de infección $\times$ ($3 \times 10^5/100$) $\times$ d; donde "d" es el factor de dilución del sobrenadante viral y "% de infección" es el porcentaje de células positivas para la GFP como se determinó por medio del análisis FACS utilizando diluciones del sobrenadante viral que transduce entre 1% y 5% de las células objetivo positivas para GFP.

10. Transducción de células primarias

Se incubaron células CD34⁺ purificadas durante la noche en placas de 12 pozos con una densidad de 2×10^6 células/poro en 2 ml de medio SFEM StemSpan suplementado con antibióticos (StemCell Technologies, Meylan, Francia) y con 10 ng/ml de trombopoyetina (TPO; Peprotech Inc, Londres, RU). Se sembraron luego células CD34⁺ activadas previamente en placas de 96 pozos (10^4 /poro) y fueron transducidas con vectores pseudotipados en un volumen total de 200 µl de medio StemSpan que contenía TPO y 6 µg/ml de polibreno. Las multiplicidades variables de infección (MOI) determinadas utilizando células objetivo TE671, fueron aplicadas a las células objetivo y estuvieron en el rango de 0,5 a 60 partículas infecciosas/célula objetivo. La transducción en pozos recubiertos con retronectina (CH-296; Takara Shuzo, Japón), se llevó a cabo utilizando el mismo protocolo en placas de 96 pozos recubiertas previamente durante 2 h con 8 µg de retronectina/poro. Después de 16 horas, se lavaron las células CD34⁺, se las suspendió en 400 µl de medio StemSpan suplementado con suero fetal de ternera al 10% (Life Technologies, Francia), con antibióticos, y con 10 ng/ml de Flt3-L, TPO, y un factor de células madre (SCF) durante 3 días. Se analizó la expresión de la GFP por medio de análisis FACS 5 días después de la infección.

Se activaron previamente los PBL humanos y de macaco durante 24 h antes de la infección como se describió previamente por medio de la adición de 1 µg de anticuerpos anti - CD3 (HIT3a, Pharmingen) y anticuerpos anti - CD28 (CD28.2, Pharmingen) a 1 ml de medio que contenía 2×10^6 PBL humanos²⁹ o por medio de la adición de 5 ng/ml de concanavalina A y 10 ng/ml de IL2 a 2×10^6 PBL de macaco³⁷. Para la transducción, se mezclaron 10^5 PBL activados con los vectores pseudotipados en un volumen total de 1 ml de medio de PBL suplementado con 6 µg/ml de polibreno, durante 4 h a 37°C. Después de la infección, se lavaron las células en PBS y se incubó a 37°C durante 5 días en RPMI - 1640 (Life Technologies, Francia) suplementado con IL2 hasta que se determinó la eficiencia de la transducción por medio de análisis FACS.

B. Ejemplos 1 - 10

Ejemplo 1

50 Habilidad de diferentes glicoproteínas virales para pseudotipar un vector del SIV

Examinamos un panel de glicoproteínas virales (GP) por su habilidad para pseudotipar vectores lentivirales derivados del virus de inmunodeficiencia simia (SIVmac251). Estas glicoproteínas se derivaron de retrovirus tipo C de mamífero, tal como las GP de Env del retrovirus endógeno de felino RD 114, de las GP del virus anfitriónico de leucemia de mardo (MLV-A), del MLV-10A1 y del virus de leucemia del mono Gibón (GALV) o de las GP de los virus envueltos en membrana, tales como las GP del virus de la peste de las aves de corral (hemaglutinina de FPV - FPV - HA), del virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV), del virus del Ébola (EboV), y del virus de la estomatitis vesicular (VSV). Se generaron los vectores pseudotipados del SIV por medio de expresión transitoria en células 293T transfectadas con tres plásmidos (Fig. 1) que codifican las proteínas del núcleo viral del SIV, un vector de transferencia con base en el SIV que aloja al gen marcador de la GFP, y las diferentes GP. Los ensayos de infección sobre células de rhabdomyosarcoma humano TE671 indicaron que se obtuvieron títulos superiores a 10^5 i.u./ml para vectores generados con las GP VSV, LCMV, MLV-A y MLV-10A1 (Fig. 2A). En contraste, los vectores generados con las GP de EboV y FPV tuvieron títulos bajos, menores de 5×10^3 i.u./ml. Los vectores SIV generados con las GP GALV y RD 114 tuvieron títulos intermedios, entre 10^4 y 5×10^4 i.u./ml. Estas diferencias relativas en infectividad de los vectores pseudotipados se reprodujeron sobre otras células objetivo tal como las células 293T (datos no mostrados), sugiriendo que la determinación de los títulos infecciosos sobre las células TE671 reflejaron la capacidad de las diferentes GP para pseudotipar núcleos del SIV.

Los títulos infecciosos obtenidos con vectores del SIV generados con las GP FPV, GALV y RD 114 fueron sorprendentemente bajos en comparación con aquellos logrados con los vectores del MLV pseudotipados con las mismas glicoproteínas^{21, 34, 38}. Ya que la gemación de las partículas del núcleo lentiviral no depende de la expresión de glicoproteínas virales³⁹, esto sugiere que los viriones no podrían incorporar eficientemente estas GP o, alternativamente, que no podrían salir de células productoras después del montaje de la GP. En realidad, cuando las células productoras de vectores que expresan al FPV-HA fueron tratadas con neuraminidasa, se incrementó fuertemente la infectividad de los vectores pseudotipados con HA hasta en 100 veces (Fig. 2A). Este reforzamiento está correlacionado con una producción incrementada 50 veces de partículas virales en el sobrenadante de las células productoras (datos no mostrados). Esto estaba más probablemente inducido por la liberación de viriones mediada por la neuraminidasa a partir de la superficie de la célula sobre la cual estaban retenidos debido al enlazamiento con moléculas de la superficie de la célula que contenían ácido siálico^{40, 41}. Sin embargo, tal defecto en la salida del virión no pudo explicar la falta de infectividad de los vectores del SIV generados con las GP GALV y RD 114 ya que los títulos de los vectores del MLV pseudotipados con estas última glicoproteínas son generalmente altos^{21, 34}. Esto sugiere más bien, un defecto en el nivel de incorporación de GP sobre los núcleos lentivirales. Estudios previos han indicado que la cola citoplasmática de los retrovirus tipo C de mamífero soporta elementos que controlan la formación y/o la infectividad de pseudotipos con lentivirus de primate^{8, 13-15}. Ya que la GP del MLV-A pseudotipa vectores lentivirales (Fig. 2A), sacamos la hipótesis de que su cola citoplasmática debe contener todos los elementos requeridos para la incorporación óptima de GP sobre partículas lentivirales. En realidad, el reemplazo de la cola citoplasmática de las GP RD 114 (Fig. 2B) y de GALV con aquella de la GP MLV-A dio como resultado una incorporación mucho mayor de cualquier glicoproteína sobre núcleos lentivirales, como se muestra en la Fig. 2C para el RD 114 y en otra parte para la GP GALV^{8, 13, 15}. Estas GP quiméricas GALV y RD 114, llamadas GALV/TR y RD 114/TR, preservaron el rango como hospedadores de las glicoproteínas iniciales, como se evaluó en los ensayos de interferencia del receptor (datos no mostrados), y confirieron títulos incrementados 25 veces a los vectores del SIV (Fig. 2A).

25 Ejemplo 2

Caracterización de estirpes de vectores pseudotipados con base en SIV

Buscamos caracterizar las propiedades de los vectores recubiertos con las glicoproteínas virales modificadas o no modificadas que pseudotiparon eficientemente las partículas del vector del SIV. Se concentraron los pseudotipos del vector del SIV por medio de ultracentrifugación, se los suspendió en un amortiguador de almacenamiento que contenía BSA al 1%, se formaron alícuotas y se almacenó a -80°C antes de los ensayos de infección. Aunque los vectores recubiertos con GP MLV-10A1 tuvieron títulos razonables antes de la concentración, no fueron utilizados en los análisis adicionales debido a que no pudieron ser concentrados en forma eficiente (datos no mostrados). En contraste, se pudieron concentrar en forma muy eficiente los vectores pseudotipados con las glicoproteínas de FPV-HA, VSV-G o con las glicoproteínas de GALV/TR, RD114/TR, MLV-A y LCMV, permitiendo la recuperación de más del 80%, en promedio, de las partículas infecciosas después de una concentración de 100 veces de las partículas físicas (datos no mostrados). Ya que los vectores pseudotipados con las glicoproteínas de FPV-HA y de LCMV fallaron en transducir las células hematopoyéticas primarias analizadas aquí (esto es, las células PBL y CD34⁺; datos no mostrados), no se los analizó más. Se determinaron los títulos infecciosos de las estirpes concentradas de los vectores pseudotipados con las glicoproteínas restantes (esto es, MLV-A, GALV/TR, RD 114/TR y VSV-G) utilizando células objetivo TE671 y estaban en el rango de 5×10^6 para los pseudotipos menos infecciosos, obtenidos con la GP GALV/TR, hasta 1×10^8 i.u./ml para aquellos más infecciosos, obtenidos con VSV-G (Fig. 3A). Se detectaron diferencias similares en títulos entre los pseudotipos del vector sobre otras líneas celulares adherentes humanas (datos no mostrados). Esto indicó que la determinación del título utilizando las células TE671 altamente permisivas reflejó la evaluación de la infectividad específica de vectores pseudotipados. Notablemente, el número de partículas infecciosas se correlacionó con la presencia de partículas físicas. Como se muestra en la Fig. 3B, dentro de una preparación dada de vectores pseudotipados, se detectaron cantidades similares de proteína de cápside asociada con el virión para los pseudotipos del vector que produjeron los títulos más altos (VSV-G y MLV-A o las GP RD 114/TR). Se detectaron en forma reproducible menores cantidades de partículas físicas para viriones pseudotipados con las GP GALV/TR, de acuerdo con sus títulos más bajos (Fig. 3A). Sin embargo, se observaron diferencias importantes en las cantidades absolutas de proteínas de la cápside asociadas al virión, cuando se compararon dos preparaciones independientes de vectores, a pesar de títulos infecciosos comparables (datos no mostrados). De este modo, para minimizar los artefactos debidos a las diferencias en la calidad de las estirpes de los vectores, cada experimento subsiguiente de evaluación fue realizado utilizando vectores pseudotipados generados al mismo tiempo. Además, ya que la detección de las proteínas de la cápside asociadas con el virión no parecieron ser un indicador válido de partículas infecciosas e imposibilitó la comparación de los resultados, se llevó a cabo la normalización de las estirpes de vectores pseudotipados utilizando títulos determinados sobre células TE671.

60 Ejemplo 3

Estabilidad de pseudotipos de vectores en sueros de primate

Los vectores adecuados para el suministro de genes *in vivo* deben ser estables a 37°C y deben retener alta infectividad en sueros de primate. Se determinó por lo tanto la estabilidad de los pseudotipos de vectores comparando los títulos de las partículas virales incubadas durante una hora a 37°C versus 4°C. Los vectores lentivirales pseudotipados con GP RD 114/TR o VSV-G fueron estables a 37°C, con más del 85% de las partículas de los vectores que permanecieron infecciosas después de incubación a 37°C (datos no mostrados). En comparación, los vectores pseudotipados

con las GP MLV-A y de GALV/TR perdieron más del 75% de infectividad después de incubación a 37°C (datos no mostrados), sugiriendo que las últimas GP incorporadas dentro de las partículas de núcleo lentiviral fueron sensibles a la temperatura.

Se evaluó la estabilidad de los vectores pseudotipados en sueros de macaco cinomólogo y de humano. Se mezclaron las mismas cantidades de partículas infecciosas pseudotipadas con sueros frescos de primate en una proporción de 50/50 (v/v) y se incubó durante una hora a 37°C. Se utilizaron como controles los sueros de primate inactivados por calor así como el suero fetal de ternera (FCS). Los resultados, representados como los porcentajes de infectividad residual después de incubación en sueros frescos de primate o inactivados por calor con relación a la infectividad de los viriones incubados con FCS (100%), se muestran en la Fig. 4. Los vectores pseudotipados con VSV-G fueron inactivados tanto con sueros humanos como de macaco, dando como resultado una degradación de más del 90% de las partículas virales. Los vectores pseudotipados con las glicoproteínas retrovirales fueron significativamente más resistentes en sueros humanos, aunque sus niveles de resistencia fueron variables de acuerdo con la muestra de suero analizada y el tipo de GP retroviral. Los vectores pseudotipados con glicoproteínas del MLV-A fueron estables en suero humano pero fueron relativamente sensibles a la inactivación por suero de macaco. Los vectores recubiertos con GP GALV/TR mostraron niveles variables de estabilidad en sueros humanos y de macaco. En contraste, los vectores lentivirales pseudotipados con la GP RD 114/TR exhibieron estabilidad completa en todos los sueros humanos analizados (Fig.4A) y presentaron buena estabilidad en sueros de macaco (Fig. 4B).

Ejemplo 4

Transducción de células hematopoyéticas primarias de humano y de macaco

A continuación comparamos los diferentes pseudotipos de vectores por su capacidad para transducir células hematopoyéticas primarias tales como las células CD34⁺ y las PBL. Las células CD34⁺ humanas derivadas de sangre movilizada fueron previamente activadas durante la noche en medio libre de suero suplementado con TPO y fueron transducidas durante 16 horas con un solo golpe de vectores del SIV pseudotipados con las glicoproteínas de MLV-A, GALV/TR, RD 114/TR o VSV-G. Se utilizaron las multiplicidades variables de infección (MOI), como se las determinó utilizando títulos infecciosos evaluados sobre células TE671, para transducir las células CD34⁺. Ambos experimentos de transducciones se realizaron en presencia, o en ausencia de un fragmento de retronectina CH-296⁴²⁻⁴⁴. Después de la infección se desarrollaron las células durante 5 días en presencia de bajas concentraciones de TPO, SCF y Flt3-L. Se detectó fácilmente la expresión de GFP en las células transducidas por medio de citometría de flujo, permitiéndonos evaluar la influencia de las MOI y el pseudotipado de GP sobre la eficiencia de la transducción (Fig. 5A). Para la transducción en ausencia de retronectina, se incrementó inicialmente el porcentaje de células GFP⁺ como una función directa de la MOI y las curvas achatadas en las MOI comprendidas entre 2 y 20, que alcanzan un máximo de 25% de células GFP⁺. Estas eficiencias moderadas de transducción fueron probablemente debidas al protocolo de infección por debajo del óptimo, y específicamente a la incubación única y corta de células objetivo con viriones. En estas condiciones experimentales, los vectores más eficientes fueron aquellos pseudotipados con la glicoproteína de VSV-G (promedio de células GFP⁺: 24,75% $\pm$ 3,23%; n = 5), aunque, con MOI inferiores a 2, los vectores de SIV pseudotipado con las GP GALV/TR y MLV-A exhibieron una eficiencia de transducción más alta que aquella de los vectores pseudotipados con NSV-G (ver el recuadro en la Fig. 5A). Sin embargo, entre más eficientes las MOI analizadas, los vectores generados con las glicoproteínas de MLV-A, GALV/TR y RD 114/TR lograron eficiencias de transducción menores en 5 a 12 veces que los pseudotipos de VSV-G (Fig. 5A). Los títulos relativamente bajos de los vectores generados con la GP GALV/TR (Fig. 3A) no permitieron que se evaluara la eficiencia de la transducción con MOI altas. Se obtuvieron resultados divergentes cuando se llevaron a cabo las infecciones de las células CD34⁺ sobre placas recubiertas con retronectina (Fig. 5A). Bajo estas condiciones, los vectores pseudotipados con VSV-G retuvieron la misma eficiencia máxima de transducción (24,56% $\pm$ 3,27% de células GFP⁺; n = 5) que en ausencia de retronectina, de acuerdo con los resultados de otros⁴⁵. En contraste, los vectores pseudotipados con RD 114/TR exhibieron una eficiencia de transducción incrementada 10 veces, alcanzando hasta un 65% de células GFP⁺ (promedio: 51,30% $\pm$ 8,74%; n = 5), indicando que el uso combinado de GP RD 114/TR y de retronectina reforzaron sinérgicamente la infección. La retronectina también mejoró la eficiencia de la transducción de los vectores pseudotipados con las GP GALV/TR y MLV-A, incluso con una magnitud mucho menor comparada con la de los vectores pseudotipados con la GP RD 114/TR (Fig. 5A).

Transferimos luego las células CD34⁺ de macaco derivadas de médula ósea con los vectores pseudotipados (Fig. 5B). En ausencia de retronectina, la mejor GP de pseudotipado fue la VSV-G, permitiendo la transducción de hasta un 25% de las células GFP⁺ (21,7% $\pm$ 3,51%; n = 5). Los vectores de SIV pseudotipados con las GP GALV/TR y con las MLV-A fueron los menos eficientes para transducir células CD34⁺ de macaco (eficiencia máxima de transducción de 3% de células GFP⁺). Comparado con los vectores pseudotipados con VSV-G, los vectores pseudotipados con la GP RD 114/TR dieron como resultado una transducción 2 veces menos eficiente (10,12% $\pm$ 1,26%, n = 4). La presencia de retronectina durante la transducción no mejoró la eficiencia de la transducción por medio de los vectores pseudotipados con VSV-G (Fig. 5B). Sin embargo, en una forma similar a la transducción de las células CD34⁺ humanas, la retronectina mejoró la transducción de las células CD34⁺ de macaco por medio de vectores lentivirales pseudotipados con las GP MLV-A y RD 114/TR. Bajo estas condiciones, se podrían obtener niveles máximos de transducción de hasta 30% de células GFP⁺ (24,23% $\pm$ 4,15%, n = 5) con vectores pseudotipados con RD 114/TR (Fig. 5B).

Determinamos luego las eficiencias de transducción de los vectores pseudotipados de SIV en las PBL humanas y de macaco. Las PBL, aisladas de sangre fresca, fueron incubadas durante 4 horas con los vectores en ausencia de retronectina. La activación previa de las PBL durante 24 horas con anticuerpos solubles anti-CD3 y anti-CD28 fue necesaria para la transducción con vectores lentivirales, como se reporté previamente^{26, 29, 46}. Como resultado de estas condiciones experimentales que favorecieron la estimulación y la supervivencia de las células CD3⁺, la transducción de las PBL estuvo orientada a las células T. La expresión de GFP, determinada 5 días después de la infección (Fig. 6), mostró que la transducción de las PBL era dependiente de la MOI. Con bajas MOI, los porcentajes de células GFP⁺ se incrementaron constantemente para los diferentes pseudotipos de vectores hasta alcanzar un nivel constante. Las MOI requeridas para alcanzar estos niveles constantes variaron con el pseudotipo del vector. Se alcanzaron rápidamente los niveles constantes de transducción con MOI menores a 5 partículas infecciosas por célula para vectores lentivirales pseudotipados con VSV-G, con GP MLV-A o con GP GALV/TR (Fig. 6A). En contraste, el umbral necesario de MOI para alcanzar un nivel constante con viriones pseudotipados con GP RD 114/TR fue aproximadamente de 5 - 10 partículas infecciosas por célula (Fig. 6A). En forma muy interesante, los niveles máximos de transducción también variaron con el pseudotipo del vector analizado. Los vectores pseudotipados con VSV-G únicamente transdujeron un máximo de 10 - 23% de células T (promedio: 16,87% $\pm$ 6,53%; n = 4). Este nivel algo bajo de transducción está de acuerdo con nuestros resultados previos²⁶ obtenidos con un vector derivado de VIH-1 pseudotipado con VSV-G de la misma generación y diseñado como el vector SIV-T1⁺ utilizado en este reporte. En contraste, se lograron niveles mucho más altos de transducción, que alcanzaron 50 - 75%, con vectores pseudotipados con la GP quimérica RD 114/TR (55,04% $\pm$ 11,74%; n = 4). Las eficiencias máximas de transducción obtenidas con los otros vectores pseudotipados permanecieron bajas aunque, como se mencionó anteriormente, los títulos bajos de vectores recubiertos con la GP quimérica de GALV/TR no nos permitieron evaluar las MOI superiores a 2. Adicionalmente, para algunas preparaciones del vector, se encontró que la eficiencia de transducción disminuyó cuando se utilizaron MOI altas de vectores de SIV pseudotipados con GP MLV-A o GP GALV/TR para transducir las PBL humanas (Fig. 6A). Este efecto probablemente fue debido a la competición por el enlazamiento del receptor inducido por un exceso de partículas defectuosas o por GP soluble “despojada” de partículas virales, como se sugiere en estudios recientes^{44, 47}.

Se obtuvieron resultados similares para la transducción de las PBL de macaco, aunque el umbral de las MOI necesario para alcanzar los niveles constantes de infección pareció superior a aquellos necesarios para las PBL humanas y los niveles máximos de transducción fueron menores a aquellos obtenidos con las PBL humanas (Fig. 6B). Las eficiencias de transducción obtenidas con partículas del vector pseudotipadas con las GP GALV/TR o MLV-A permanecieron muy bajas (menores a 4 - 12% de células GFP⁺) y se encontró que disminuyeron con MOI superiores a 1. En comparación con los vectores pseudotipados con estas últimas GP o con VSV-G (15,32% $\pm$ 10,06%; n = 4), se facilitó la transducción de PBL con los vectores pseudotipados con GP RD 114/TR. Hasta un 40% de las células GFP⁺ podría ser transducido (26,86% $\pm$ 8,07%; n = 4) aunque se podrían esperar claramente niveles superiores de transducción cuando se utilizan MOI superiores a aquellas aplicadas en estos experimentos.

Todos estos resultados juntos indicaron que la glicoproteína RD 114/TR era particularmente potente para permitir la transducción de células CD34⁺ de primate y las PBL con vectores pseudotipados de SIV, aunque los vectores pseudotipados de SIV con GP RD 114/TR requirieron del fragmento CH-296 de retronectina para una transducción óptima de células CD34⁺ estimuladas a corto plazo.

Ejemplo 5

Diseño de mutantes de cola citoplasmática de GP RD 114

Como se determinó por medio de la morfología de su partícula de núcleo intracelular, el virus endógeno de felino RD 114 es un retrovirus de mamífero tipo C (32). Sin embargo su GP es típica de aquellos retrovirus tipo D de simio (28), con los cuales comparte el mismo receptor de la superficie de la célula, RDR (31, 38), y soporta una significativa homología con la GP MPMV (virus de mono de Mason-Pfizer), en la subunidad TM, en particular (Fig. 7). En un reporte previo, hemos encontrado que la glicoproteína del virus endógeno de felino RD 114 no permitió la formación eficiente del pseudotipo con núcleos lentivirales (35). Aquí buscamos investigar los determinantes de la GP RD 114 que restringen el pseudotipado con vectores lentivirales derivados de SIV (virus de inmunodeficiencia simia).

Recientes estudios han indicado que el dominio transmembrana y/o la cola citoplasmática de retrovirus tipo C de mamífero soportan elementos que controlan la formación y/o la infectividad de pseudotipos con vectores de VIH-1 (4, 34, 36). Tres elementos posiblemente podrían influenciar la infectividad de las partículas virales en niveles diferentes: i) colocación celular de la GP y de los núcleos virales necesarios para el montaje viral, ii) interacciones de la GP con las proteínas del núcleo viral que condicionan la incorporación de GP, y iii) activación de la fusogenicidad de GP a través de la escisión de su cola citoplasmática por medio de la proteasa retroviral durante o inmediatamente después de la gemación del virión. Las GP tanto del MLV anfotrópico (MLV-A) como RD 114 pseudotipan eficientemente las partículas del núcleo de MLV (6, 39). Por lo tanto, ya que la GP MLV-A también pseudotipa eficientemente los núcleos virales de SIV (24, 35), asumimos que debe contener elementos que controlan óptimamente el montaje y/o la infectividad de los pseudotipos del vector de SIV, en contraste con aquellos transportados por la GP RD 114. De este modo, para definir los determinantes que restringen la capacidad de la GP RD 114 para pseudotipar partículas de núcleo lentiviral, generamos un panel de mutantes de GP RD 114 dentro de los cuales se reemplazaron subregiones derivadas de su dominio transmembrana (TMD) y/o su cola citoplasmática (CT) por sus contrapartes derivadas de la GP MLV-A (Fig. 7B). Se generó un RD/TR mutante para dirigir la importancia de la misma CT de MLV. Los RD/MTR y RD/eMTR mutantes transportaban el TMD de MLV además de la CT de MLV. La GP RDRless era

una versión truncada de la GP RD 114 y fue generada por medio de la inserción de un codón de detención en una posición correspondiente a un sitio putativo de escisión de su CT (ver más adelante). El RDP^rMLV mutante albergó el reemplazo del sitio de escisión putativo de la CT de RD 114 con aquel de la GP MLV. Las colas citoplasmáticas de los otros mutantes, RDP^rSIV_{ARLM}, RDP^rSIV_{RQAG} y RDP^rVIH, contenían sustratos para las proteasas del núcleo de SIVmac o VIH-1, que se derivaron respectivamente de los sitios de escisión encontrados en las proteínas Gag de SIVmac251 o de VIH-1. Finalmente, se diseñó el RDΔYXXL mutante para evaluar la importancia de un motivo putativo de endocitosis de tirosina transportado por la CT de RD 114, que podría influenciar la localización de GP, la expresión en la superficie de la célula y/o la fusogenicidad. La influencia de este motivo ha sido bien caracterizada para otras GP retrovirales (1, 13, 19).

La producción de todos los mutantes de GP se logró utilizando vectores de expresión idénticos bajo el control de un promotor de CMV. Las células productoras 293 fueron cotransfectadas con plásmidos que codifican a los componentes de las partículas del vector, esto es, las proteínas del núcleo viral, el vector de transferencia y cualquiera de las diferentes GP. No se detectaron variaciones en las cantidades de cualquiera de las proteínas del núcleo o de las GP, de acuerdo al monitoreo realizado por medio de inmunotransferencias de los lisados celulares utilizando anticuerpos SU anti-RD 114 (datos no mostrados).

Ejemplo 6

Modificaciones de la cola citoplasmática de la GP RD 114 que alteran la fusogenicidad célula-célula

Los cultivos de las células que expresan GP mostraron la formación de sincitios, cuya incidencia se encontró que dependía del tipo de mutación introducida en la cola citoplasmática (Fig. 8). Comparada con la GP del MLV-A de tipo silvestre, la expresión de la GP no modificada en sí misma de RD 114 indujo una formación significativa de sincitios. Este efecto parece ser causado por un control ineficiente de la fusogenicidad de GP por la CT de RD 114 ya que su sustitución con aquella de MLV-A (RD/TR, RD/MTR y RD/eMTR mutantes) reduce significativamente el número de sincitios en las células transfectadas hasta los niveles detectados con la GP MLV-A de tipo silvestre (Fig. 8). Las otras GP quiméricas de RD 114 indujeron niveles variables de sincitios. Se observaron efectos citopáticos máximos para los mutantes RDP^rHIV y RDRless. Con la excepción de RDP^rSIV_{ARLM} que era tan fusogénico como la GP no modificada de RD 114, las otras quimeras (RDΔYXXL, RDP^rMLV, y RDP^rSIV_{RQAG}) indujeron la formación de sincitios en niveles superiores que aquellos obtenidos con la GP RD 114 de tipo silvestre (Fig. 8). La fusogenicidad alterada célula-célula estaba intrínsecamente enlazada a las modificaciones de la GP RD 114 y no fue influenciada por la interacción con los otros componentes virales presentes en las células transfectadas. En realidad, se detectaron los mismos niveles de sincitios ya sea que las células expresaran o no, a las proteínas oncoretrovirales o del núcleo lentiviral (datos no mostrados). Ya que no se pudo encontrar variación en la expresión de GP para las diferentes quimeras de GP RD 114, estos resultados establecieron el papel jugado por la cola citoplasmática de la GP RD 114 en el control de la fusogenicidad célula-célula. Este control de la fusión mediado por la CT era una reminiscencia de otros GP de los retrovirus tipo C y D de mamífero, tales como los MLV y MPMV (2, 30, 33). La modificación de la secuencia de la cola citoplasmática de la glicoproteína RD 114 muy probablemente alteró sus propiedades inhibitoras de la fusión, en la etapa de desarrollo de la GP MLV-A (14, 17, 43). De este modo, para minimizar los efectos citopáticos inducidos por las modificaciones de la GP RD 114 que podrían ser contraproducentes para la formación de partículas virales, se llevaron a cabo en un breve lapso recolecciones de viriones en los sobrenadantes de las células productoras, esto es, 36 horas después de la transfección.

Ejemplo 7

Modificaciones de la cola citoplasmática de la GP RD 114 que modula el pseudotipado de vectores oncoretrovirales o lentivirales

Se determinó la capacidad de los mutantes de la GP RD 114 para pseudotipar ya sea a los vectores con base en SIVmac251 o MLV comparativamente con la GP RD 114, la GP MLV-A y VSV-G. La infectividad de los vectores generados en presencia de las diferentes GP fue evaluada utilizando células objetivo TE671 (Fig. 9). En forma consistente con nuestros resultados previos, la GP no modificada de RD 114 podría pseudotipar bien a los vectores con base en MLV (6), pero no eficientemente a los vectores con base lentiviral (35). Tanto los vectores de SIV como de MLV generados con el mutante de la GP RDΔYXXL tuvieron de 3 a 4 veces menos títulos que los vectores pseudotipados con la GP no modificada de RD 114 (Fig. 9). Los títulos de los vectores generados con el RDRless mutante hiperfusogénico fueron también menores que aquellos generados con la GP RD 114 de tipo silvestre, sin embargo no podríamos excluir que el efecto citopático particularmente fuerte ejercido por este mutante (Fig. 8) no excluye la formación óptima de partículas de vectores. En forma muy importante las GP quiméricas de RD/TR y RD/MTR pseudotiparon en forma eficiente a los vectores con base en SIV. En el caso del mutante de RD/TR, esto resultó en títulos infecciosos superiores a 10⁶ i. u./ml; esto es, hasta 25 veces superior que aquellos obtenidos con las GP RD 114 de tipo silvestre, y en el mismo rango, sino superior, que los títulos infecciosos obtenidos con los vectores de SIV pseudotipados con la GP MLV-A o de VSV-G (Fig. 9B). En contraste, los vectores derivados de MLV generados con las mismas GP quiméricas mostraron únicamente un incremento de infectividad hasta de 2 veces comparado con los vectores pseudotipados con la GP RD 114 de tipo silvestre, cuyos títulos ya eran altos (Fig. 9A). Ya que la cola citoplasmática fue el dominio mínimo modificado en estas quimeras de GP RD 114 que condujeron a una mayor infectividad de vectores lentivirales pseudotipados, estos datos sugirieron por lo tanto que la CT de MLV-A, en vez de su TMD, alojó un componente que facilitó la formación del pseudotipo con vectores de SIV. La investigación de quimeras adicionales de GP RD 114

(Fig. 7B) estableció que este componente estaba localizado en una región que abarcaba un sitio putativo de escisión en su cola citoplasmática.

La remoción mediada por la proteasa viral del extremo C-terminal de las proteínas TM de los retrovirus tipo C y D de mamífero, llamadas péptido R para los MLV, ha mostrado ser esencial para activar sus funciones de fusión (2, 30, 33). Este procesamiento carboxi-terminal de las proteínas TM se presenta durante o después de la gemación de los viriones. Hasta el momento no se ha reportado la escisión de la cola citoplasmática y la posterior activación de la fusogenicidad para la GP RD 114. Nuestros resultados indican que probablemente se requiera también el procesamiento de la TM de RD 114 con el propósito de promover la actividad completa de fusión de la glicoproteína por enlazamiento del receptor. En realidad, el truncamiento de la GP RD 114 por inserción de un codón prematura de detención (RDRless mutante) dio como resultado una alta actividad fusogénica célula-célula (Fig. 8), un fenotipo similar a aquel de los mutantes de la GP truncada en R ya sea de los retrovirus de mamífero tipo C o tipo D (2, 10, 30, 33). Además, el alineamiento de la secuencia de la cola citoplasmática de la GP RD 114 con las CT de diferentes GP retrovirales de mamífero tipo C y tipo D permitió predecir la posición de una secuencia de 8 aminoácidos de longitud - VHAMVLAQ - en la cola citoplasmática de la GP RD 114 que más probablemente formó un sitio de escisión de la proteasa retroviral (Fig. 7A). En forma muy interesante, en reemplazo de esta secuencia por los sitios de escisión derivados de la CT de MLV (RDPrMLV mutante) o de las proteínas Gag de SIV (RDPrSIV_{ARLM} y RDPrSIV_{RQAG} mutantes) dio como resultado en un incremento de la infectividad hasta de 7 veces de los pseudotipos del vector de SIV (Fig. 9B). Igualmente, la inserción de un sitio de escisión derivado de las proteínas Gag de VIH-1 (RDPrHIV mutante) incrementó selectivamente la formación del pseudotipo con vectores con base en VIH-1 (datos no mostrados), pero no con los vectores derivados de SIV (Fig. 9B). Estos resultados indicaron por lo tanto que esta secuencia de 8 aminoácidos contiene un componente esencial que modula la formación del pseudotipo con partículas del vector lentiviral.

Se obtuvieron resultados muy diferentes cuando se utilizaron estas últimas quimeras de GP RD 114 para pseudotipar las partículas del vector de MLV (Fig. 9A) aunque los vectores de MLV pseudotipados con el mutante de RDPrMLV mostraron una infectividad ligeramente mayor o similar comparada con los pseudotipos virales formados con la GP RD 114 de tipo silvestre, las GP quiméricas de RD 114 que hospedan sitios de escisión lentivirales (RDPrSIV_{ARLM}, RDPrSIV_{RQAG} y RDPrHIV) disminuyeron dramáticamente la infectividad de los vectores pseudotipados con MLV, hasta en 20 veces (Fig. 9A). De este modo, las quimeras de RD 114 se comportaron en forma diferencial cuando se las asoció ya sea con núcleos lentivirales u oncoretrovirales. Por lo tanto, estos resultados sugieren fuertemente que se presentaron interacciones particulares de las CT/núcleo en una forma específica de acuerdo al tipo de virus y podría la incorporación de GP y/o el procesamiento de la cola citoplasmática.

Ejemplo 8

Modificaciones de la cola citoplasmática de GP RD 114 que alteran la incorporación viral

Buscamos entonces determinar si las modificaciones de la glicoproteína RD 114 podrían afectar su incorporación sobre las partículas virales. Estos experimentos fueron realizados comparativamente con GP no modificada de RD 114 sobre un subconjunto de los mutantes de GP, RDPrMLV, RDPrSIV_{ARLM}, RDPrSIV_{RQAG} y RD/TR, que no indujeron formación de sincitios en una forma muy extensa (Fig. 8). En realidad, la gran actividad fusogénica célula-célula de los otros mutantes (RDPrHIV y RDRless) comprometió la calidad de las preparaciones purificadas del virión por medio de la liberación de residuos celulares en los sobrenadantes de las células productoras (datos no mostrados). Se generaron partículas virales que transportan ya sea núcleos de SIV o de MLV con las quimeras de GP RD 114 y se las purificó por medio de ultracentrifugación a través de almohadillas de sacarosa al 20%. La detección y cuantificación tanto de las proteínas del núcleo viral como de las glicoproteínas fueron llevadas a cabo por medio de inmunotransferencias de los viriones purificados utilizando anticuerpos de GP anti-CA o anti-RD 114 y se permitió medir las densidades de las quimeras de GP RD 114 sobre las partículas virales (Fig. 4). No se pudieron detectar GP en los precipitados de sobrenadantes ultracentrifugados de las células productoras que únicamente expresaron las glicoproteínas en ausencia de núcleos virales (Fig. 4), demostrando así la especificidad de las señales obtenidas con los viriones purificados. Comparado con la GP RD 114 de tipo silvestre, se incorporo igualmente bien el mutante de GP RDPrSIV_{ARLM} sobre partículas del núcleo de SIV, a pesar de la mayor infectividad conferida por esta GP (Fig. 9B). En contraste, la incorporación de las GP quiméricas de RDPrMLV, RDPrSIV_{RQAG} y RD/TR sobre las partículas del vector de SIV se incrementó de 3 a 10 veces (Fig. 4), de acuerdo con los títulos fuertemente mejorados obtenidos con estas GP mutantes (Fig. 9B). De este modo, estos resultados indicaron que la incorporación de las quimeras de GP RD 114 sobre las partículas de los núcleos de SIV y los títulos infecciosos de los vectores pseudotipados estaban correlacionados, aunque el caso del mutante de GP RDPrSIV_{ARLM} descartó una correlación absoluta.

Se obtuvieron resultados contrastantes por la incorporación de las mismas quimeras de GP sobre las partículas del núcleo de MLV. La incorporación de la quimera de GP RD/TR se incrementó débilmente, hasta en 2 veces (Fig. 4), en forma consistente con los títulos virales ligeramente mejorados obtenidos con este mutante particular (Fig. 9A). Sin embargo, comparado con la GP RD 114, los mutantes de GP RDPrMLV, RDPrSIV_{ARLM} y RDPrSIV_{RQAG} tenían densidades similares sobre las partículas de MLV (Fig. 4), a pesar de los títulos fuertemente reducidos de las dos últimas quimeras de GP sobre los vectores pseudotipados de MLV (Fig. 9A). Por lo tanto, sobre los núcleos pseudotipados de MLV, no se pudo demostrar una correlación entre la incorporación de GP y la infectividad.

Ejemplo 9

Modificaciones de la cola citoplasmática de GP RD 114 que alteran su escisión en una forma que depende del núcleo viral

Investigamos luego si la cola citoplasmática de las quimeras de GP RD 114 fue escindida en MLV pseudotipado o en las partículas del núcleo viral de SIV. Las células transfectadas, que producen cualquiera de los dos tipos de viriones pseudotipados, fueron marcados radioactivamente con metionina con ^{35}S y cisteína con ^{35}S . Se incubaron los lisados de las células productoras del virión o de los viriones purificados sobre almohadillas de sacarosa al 20% con anticuerpos SU anti-RD 114. Después de la inmunoprecipitación de las glicoproteínas, se redujeron y desnaturalizaron las muestras para permitir la disociación de las proteínas TM para los complejos inmunoprecipitados de GP y luego se las analizó por medio de SDS-PAGE (Fig. 5). Los lisados de las células productoras del virión revelaron cantidades similares tanto de glicoproteínas TM como SU, como se esperaba. Todas las glicoproteínas TM mutantes tenían la misma movilidad electroforética sobre los geles (Fig. 5A y B), indicando que la mayoría de las CT de las diferentes especies de TM no se escindieron dentro de las células productoras. Estos resultados también confirmaron que la modulación de la fusogenicidad célula-célula de las GP mutantes de RD 114 no era dependiente del procesamiento de sus proteínas TM (Fig. 8) sino más bien, estaba intrínsecamente relacionada con la alteración de la estructura o la conformación de sus colas citoplasmáticas.

Las diferentes quimeras de GP RD 114 tenían intensidades similares sobre los núcleos virales purificados de MLV, tanto para las subunidades TM como SU (Fig. 5A). Este resultado confirmó que la modificación de sus colas citoplasmáticas no afectó su incorporación sobre los núcleos oncoretrovirales (Fig. 4). Sin embargo, se detectó el procesamiento de las glicoproteínas TM incorporadas en una forma dependiente del tipo de quimera de GP RD 114. En realidad, comparado con el tamaño de sus proteínas TM en los lisados celulares, las subunidades de TM de la GP no modificada de RD 114 y de la RDPrMLV quimérica y de las quimeras de RD/TR eran aproximadamente 2 kDa más cortas (Fig. 5). Esta observación confirmó directamente la evidencia genética para el procesamiento de TM de la GP RD 114 por la proteasa del núcleo viral. En contraste, únicamente de detectaron las TM no procesadas sobre núcleos de MLV para los mutantes de GP RDPrSIV_{ARLM} y RDPrSIV_{ROAG} (Fig. 5A) que alojan sitios de escisión específicos para la proteasa lentiviral (Fig. 7B). Estos resultados estaban de acuerdo con la infectividad fuertemente reducida de los vectores de MLV pseudotipados con las últimas GP quiméricas de RD 114 (Fig. 9A) y confirmó que se requiere la escisión de la cola citoplasmática de la GP RD 114 para permitir la infección del virión.

En contraste con los núcleos de MLV, se detectaron cantidades variables tanto de glicoproteína TM como SU sobre las partículas del núcleo de SIV (Fig. 5B) y estaban de acuerdo con los resultados de la incorporación diferencial de GP dentro de los viriones (Fig. 4). En el caso de los mutantes de GP RDPrSIV_{ROAG} y RD/TR cuyas SU fueron fácilmente incorporadas sobre las partículas de SIV, se podían observar las proteínas TM (Fig. 5B). Se podía detectar el procesamiento eficiente de las colas citoplasmáticas de las últimas quimeras de GP RD 114, de acuerdo con los resultados de infectividad de los pseudotipos del vector de SIV (Fig. 9B). Las proteínas TM de la GP no modificada de RD 114 de las GP mutantes de RDPrMLV y RDPrSIV_{ARLM} no fueron fácilmente detectadas bajo las condiciones normales de exposición de los geles, de acuerdo con los resultados de la incorporación (Fig. 9B). La sobreexposición de los geles reveló que las proteínas TM de las últimas GP fueron procesadas (datos no mostrados). Este resultado explicó los bajos infecciosos obtenidos con las partículas del vector de SIV generadas con estas últimas GP (Fig. 9B).

Ejemplo 10

Modificaciones de la cola citoplasmática de GP RD 114 que no afectan la localización de GP en balsas de lípido

Reportes recientes han mostrado que se pueden ensamblar y germinar los lentivirus a partir de balsas de lípido (18, 25, 26). Por lo tanto, una posibilidad para explicar la incorporación diferencial de los mutantes de GP RD 114 sobre las partículas pseudotipadas de SIV podría ser la variación de la colocación de los componentes del núcleo viral y de las glicoproteínas en el sitio del montaje viral como resultado de la modificación de la cola citoplasmática de GP RD 114. Por lo tanto, investigamos si la GP RD 114 se podría localizar en balsas de lípido y si la modificación de su cola citoplasmática podía alterar la localización celular. Las balsas de lípido son resistentes a los detergentes no iónicos a baja temperatura y pueden ser separadas físicamente del grueso de las membranas solubles por medio de centrifugación en gradiente de sacarosa. Las membranas de las células transfectadas con los diferentes mutantes de GP fueron fraccionadas bajo estas condiciones y se analizó el contenido de GP de las fracciones de la membrana por medio del análisis de transferencia Western (Fig. 6). La GP RD 114 de tipo silvestre así como los mutantes de la cola citoplasmática aparecieron en las fracciones resistentes al detergente de los lisados de las células transfectadas, indicando que todas las GP fueron dirigidas a las balsas.

Todas las composiciones y/o los métodos divulgados y reivindicados aquí pueden elaborarse y ejecutarse sin indebida experimentación a la luz de la presente descripción. Más específicamente, será claro que ciertos agentes que están tanto química como fisiológicamente relacionados pueden ser sustituidos por los agentes descritos aquí mientras se logren los mismos resultados o resultados similares.

Referencias

Las siguientes referencias proporcionan ejemplos de procedimientos u otros detalles suplementarios a aquellos expuestos aquí.

Patente Estadounidense No. 4.682.195

Patente Estadounidense No. 4.683.202

Patente Estadounidense No. 5.466.468

Patente Estadounidense No. 5.645.897

Patente Estadounidense No. 5.686.279

Patente Estadounidense No. 5.705.629

Patente Estadounidense No. 5.846.225

Patente Estadounidense No. 5.846.233

Patente Estadounidense No. 5.925.565

Patente Estadounidense No. 5.928.906

Patente Estadounidense No. 5.935.819

Patente Estadounidense No. 5.994.136

Patente Estadounidense No. 6.013.516

Patente Estadounidense No. 6.136.597

EP 266.032

Referencias Numeradas en el Superíndice

1. **Nègre D, Duisit G, Mangeot P-E, Moullier P, Darlix J-L, Cosset F-L.** Lentiviral vectors derived from simian immunodeficiency virus (SIV). En: Trono D, ed. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Vol. 261; 2002: 53 - 74.

2. **Naldini L, Blömer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage F. H., Verma IM, Trono D.** *In vivo* gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*. 1996; 272: 263 - 267

3. **Blömer U, Naldini L, Kafri T, Trono D, Verma I. M., Gage F. H.** Highly efficient and sustained gene transfer in adult neurons with a lentiviral vector. *J Virol*. 1997; 71: 6641 - 6649

4. **Kafri T, Blömer U, Peterson D. A., Gage F. H., Verma IM.** Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors. *Nat Genet*. 1997; 17: 314 - 317

5. **Naldini L, Blömer U, Gage F. H., Trono D, Verma I. M.** Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93: 11382 - 11388

6. **Park F.** Efficient lentiviral transduction of liver requires cell cycling *in vivo*. *Nat Genet*. 2000; 24: 49 - 52

7. **Takahashi M, Miyoshi H, Verma I. M., Gage F. H.** Rescue from photoreceptor degeneration in the rd mouse by human immunodeficiency virus vector-mediated gene transfer. *J Virol*. 1999; 73: 7812 - 7816

8. **Christodoulouopoulos I, Cannon P.** Sequences in the cytoplasmic tail of the gibbon ape leukemia virus envelope protein that prevent its incorporation into lentivirus vectors. *J Virol*. 2001; 75: 4129 - 4138

9. **Desmaris N, Bosch A, Salaun C, Petit C, Prevost M. C., Tordo N, Perrin P, Schwartz O, deRocquigny H, Heard J. M.** Production and neurotropism of lentivirus vectors pseudotyped with lyssavirus envelope glycoproteins. *Mol Ther*. 2001; 4: 149 - 156

10. **Kobinger G. P., Weiner D. J., Yu Q. C., Wilson J. M.** Filovirus-pseudotyped lentiviral vector can efficiently and stably transduce airway epithelia *in vivo*. *Nat Biotechnol.* 2001; 19: 225 - 230
11. **Lewis BC, Chinnasamy N, Morgan R. A., Varmus H. E.** Development of an Avian Leukosis-Sarcoma Virus Subgroup A Pseudotyped Lentiviral Vector. *J Virol.* 2001; 75: 9339 - 9344
12. **Mochizuki H, Schwartz J. P., Tanaka K, Brady R. O., Reiser J.** High-Titer Human Immunodeficiency Virus Type 1 - Based Vector Systems for Gene Delivery into Nondividing Cells. *J. Virol.* 1998; 72: 8873 - 8883
13. **Salmon P, Nègre D, Trono D, Cosset F-L.** A chimeric GALV-derived envelope glycoprotein harboring the cytoplasmic tail of MLV envelope efficiently pseudotypes HIV-1 vectors. *J Gen Med.* 2000; 2 (sup): 23
14. **Sandrin V, Boson B, Cosset F-L.** Insertion of lentiviral protease substrates in the cytoplasmic tail of the feline endogenous virus RD114 glycoprotein enhances viral incorporation and infectivity of pseudotyped lentiviral vectors. *In preparation.* 2001
15. **Stitz J, Buchholz C, Engelstadter M, Uckert W, Bloemer U, Schmitt I, Cichutek K.** Lentiviral vectors pseudotyped with envelope glycoproteins derived from gibbon ape leukemia virus and murine leukemia virus 10A1. *Virology.* 2000; 273: 16 - 20
16. **Gatlin J, Melkus M. W., Padgett A, Kelly P. F., García J. V.** Engraftment of NOD/SCID Mice with Human CD34+ Cells Transduced by Concentrated Oncoretroviral Vector Particles Pseudotyped with the Feline Endogenous Retrovirus (RD114) Envelope Protein. *J. Virol.* 2001; 75: 9995 - 9999
17. **Goemer M, Horn P. A., Peterson L., Kurre P., Storb R., Rasko J. E., Kiem H. P.** Sustained multilineage gene persistence and expression in dogs transplanted with CD34(+) marrow cells transduced by RD114-pseudotype oncoretrovirus vectors. *Blood.* 2001; 98: 2065 - 2070
18. **Kelly P, Vandergriff J, Nathwani A, Nienhuis A, Vanin E.** Highly efficient gene transfer into cord blood nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency repopulating cells by oncoretroviral vector particles pseudotyped with the feline endogenous retrovirus (RD114) envelope protein. *Blood.* 2000; 96: 1206 - 1214
19. **Marandin A, Dubart A, Pflumio F, Cosset F-L, Cordette V, Chapel-Fernandes S, Coulombel L, Vainchenker W, Louache F.** Retroviral-mediated gene transfer into human CD34+/38-primitive cells capable of reconstituting longterm cultures *in vitro* and in nonobese diabetic-severe combined immunodeficiency mice *in vivo*. *Human Gene Ther.* 1998; 9: 1497 - 1511
20. **Movassagh M, Desmyter C, Baillou C, Chapel-Fernandes S, Guigon M, Klatzmann D, Lemoine FM.** High-level gene transfer to cord blood progenitors using gibbon ape leukemia virus pseudotyped retroviral vectors and an improved clinically applicable protocol. *Hum Gene Ther.* 1998; 9: 225 - 234
21. **Porter C. D., Collins M. K. L., Taylor C. S., Parker M. H., Cosset F-L, Weiss R. A., Takeuchi Y.** Comparison of efficiency of infection of human gene therapy target cells via four different retroviral receptors. *Human Gene Therapy.* 1996; 7: 913 - 919
22. **Peng K. W., Pham L, Ye H, Zufferey R, Trono D, Cosset F-L, Russell S. J.** Organ distribution of gene expression after intravenous infusion of targeted and untargeted lentiviral vectors. *Gene Therapy.* 2001; 8: 1456 - 1463
23. **Seganti L, Superti F, Girmenia C, Melucci L, Orsi N.** Study of receptors for vesicular stomatitis virus in vertebrate and invertebrate cells. *Microbiologica.* 1986; 9: 259 - 267
24. **DePolo N. J., Reed J. D., Sheridan P. L., Townsend K, Sauter S. L., Jolly D. J., Dubensky T. W.** VSV-G pseudotyped lentiviral vector particles produced in human cells are inactivated by human serum. *Mol Ther.* 2000; 2: 218 - 222
25. **Nègre D, Mangeot P, Duisit G, Blanchard S, Vidalain P, Leissner P, Winter A, Rabourdin-Combe C, Mehtali M, Moullier P, Darlix J-L, Cosset F-L.** Characterization of novel safe lentiviral vectors derived from simian immunodeficiency virus (SIVmac251) that efficiently transduce mature human dendritic cells. *Gene Ther.* 2000; 7: 1613 - 1623
26. **Salmon P, Kindler V, Ducrey O, Chapuis B, Zubler R. H., Trono D.** High-level transgene expression in human hematopoietic progenitors and differentiated blood lineages after transduction with improved lentiviral vectors. *Blood.* 2000; 96: 3392 - 3398
27. **Salmon P, Arrighi J. F., Piguet V, Chapuis B, Zubler R. H., Trono D, Kindler V.** Transduction of CD34+ cells with lentiviral vectors enables the production of large quantities of transgene-expressing immature and mature dendritic cells. *J Gene Med.* 2001; 3: 311 - 320

28. **Thiebot H, Louache F, Vaslin B, Revel Td, Neildez O, Larghero J, Vainchenker W, Dormont D, Grand R. L.** Early and persistent bone marrow hematopoiesis defect in simian/human immunodeficiency virus-infected macaques despite efficient reduction of viremia by highly active antiretroviral therapy during primary infection. *J Virol.* 2001; 75: 11594 - 11602
29. **Maurice M, Verhoeven E, Salmon P, Trono D, Russell S. J., Cosset F-L.** Efficient gene transfer into human primary blood lymphocytes by surface-engineered lentiviral vectors that display a T cell-activating polypeptide. *Blood.* 2002; 99: *In press*
30. **Mangeot P-E, Nègre D, Dubois B, Winter A. J., Leissner P, Methali M, Kaiserlian D, Cosset F-L, Darlix J-L.** Development of minimal lentiviral vectors derived from simian immunodeficiency virus (SIVmac251) and their use for the gene transfer in human dendritic cells. *J Virol.* 2000; 74: 8307 - 8315
31. **Yee J. K., Friedmann T, Bums J. C.** Generation of high-titer pseudotyped retroviral vectors with very broad host range. *Methods Cell Biol.* 1994; 43: 99 - 112
32. **Hatzioannou T, Valsesia-Wittmann S, Russell S, Cosset F-L.** Incorporation of fowl plague virus hemagglutinin into murine leukemia virus particles and analysis of the infectivity of the pseudotyped retroviruses. *J Virol.* 1998; 72: 5313 - 5317
33. **Collins M. K. L., Weiss R. A., Takeuchi Y, Cosset F-L.** Expression systems. PCT/GB96/02061. WO 97/08330. 1996
34. **Cosset F-L, Takeuchi Y, Battini J, Weiss R, Collins M.** High titer packaging cells producing recombinant retroviruses resistant to human serum. *J. Virol.* 1995; 69: 7430 - 7436
35. **Ott D, Friedrich R, Rein A.** Sequence analysis of amphotropic and 10A1 murine leukemia virus: close relationship to mink cell focus forming viruses. *J Virol.* 1990; 64: 757 - 766
36. **Takeuchi Y, Cosset F. L., Lachmann P. J., Okada H, Weiss R. A., Collins M. K. L.** Type C retrovirus inactivation by human complement is determined by both the viral genome and producer cell. *J. Virol.* 1994; 68: 8001 - 8007
37. **Matheux F, Lauret E, Rousseau V, Larghero J, Boson B, Vaslin B, Cheret A, DeMaeyer E, Dormont D, LeGrand R.** Simian immunodeficiency virus resistance of macaques infused with interferon beta-engineered lymphocytes. *J Gen Virol.* 2000; 81: 2741 - 2750
38. **Hatzioannou T, Delahaye E, Martin F, Russell S. J., Cosset F-L.** Retroviral display of functional binding domains fused to the amino-terminus of influenza haemagglutinin. *Human Gene Therapy.* 1999; 10: 1533 - 1544
39. **Freed E. O.** HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. *Virology.* 1998; 251: 1- 15
40. **Bosch V, Kramer B, Pfeiffer T, Starck L, Steinhauer D. A.** Inhibition of release of lentivirus particles with incorporated human influenza virus haemagglutinin by binding to sialic acid-containing cellular receptors. *J Gen Virol.* 2001; 82: 2485 - 2494
41. **Wagner R, Wolff T, Herwig A, Pleschka S, Klenk H. D.** Interdependence of hemagglutinin glycosylation and neuraminidase as regulators of influenza virus growth: a study by reverse genetics. *J Virol.* 2000; 74: 6316 - 6323
42. **Carstanjen D, Dutt P, Moritz T.** Heparin inhibits retrovirus binding to fibronectin as well as retrovirus gene transfer on fibronectin fragments. *J Virol.* 2001; 75: 6218 - 6222
43. **Moritz T, Dutt P, Xiao X, Carstanjen D, Vik T, Hanenberg H, Williams DA.** Fibronectin improves transduction of reconstituting hematopoietic stem cells by retroviral vectors: evidence of direct viral binding to chymotryptic carboxyterminal fragments. *Blood.* 1996; 88: 855 - 862
44. **Relander T, Brun A, Hawley R. G., Karlsson S, Richter J.** Retroviral transduction of human CD34+ cells on fibronectin fragment CH-296 is inhibited by high concentrations of vector containing medium. *J Gene Med.* 2001; 3: 207 - 218
45. **Haas D. L., Case S. S., Crooks G. M., Kohn D. B.** Critical factors influencing stable transduction of human CD34(+) cells with HIV-1-derived lentiviral vectors. *Mol Ther.* 2000; 2: 71 - 80
46. **Dardalhon V, Herpers B, Noraz N, Pflumio F, Guetard D, Leveau C, Dubart-kupperschmitt A, Charneau P, Taylor N.** Lentivirus-mediated gene transfer in primary T cells is enhanced by a central DNA flap. *Gene therapy.* 2001; 8: 190 - 198

47. **Slingsby J. H., Baban D, Sutton J, Esapa M, Price T, Kingsman S. M., Kingsman A. J., Slade A.** Analysis of 4070A envelope levels in retroviral preparations and effect on target cell transduction efficiency. *Hum Gene Ther.* 2000; 11: 1439 - 1451
- 5 48. **Ott D. E.** Cellular proteins in HIV virions. *Rev Med Virol.* 1997; 7: 167 - 180
49. **Swanstrom R, Wills J. W.** Synthesis, assembly, and processing of viral proteins. In: Coffin J. M., Hughes S. H., Varmus H. E., eds. Retroviruses. New York, USA: *Cold Spring Harbor Laboratory Press*; 1997: 263 - 334
- 10 50. **Takeuchi Y, Simpson G, Vile R, Weiss R, Collins M.** Retroviral pseudotypes produced by rescue of Moloney murine leukemia virus vector by C-type, but not D-type, retroviruses. *Virology.* 1992a; 186: 792 - 794
51. **Pickl W. F., Pimentel-Muinos F. X., Seed B.** Lipid rafts and pseudotyping. *J Virol.* 2001; 75: 7175-7183
- 15 52. **Cosson P.** Direct interaction between the envelope and matrix proteins of HIV-1. *The Embo J.* 1996; 15: 5783 - 5788
53. **Murakami T., Freed E. O.** Genetic evidence for an interaction between human immunodeficiency virus type 1 matrix and alpha-helix 2 of the gp41 cytoplasmic tail. *J Virol.* 2000; 74: 3548 - 3554
- 20 54. **Vincent M. J., Melsen L. R., Martin A. S., Compans R. W.** Intracellular interaction of simian immunodeficiency virus Gag and Env proteins. *J Virol.* 1999; 73: 8138 - 8144
55. **Wyma D. J., Kotov A, Aiken C.** Evidence for a stable interaction of gp41 with Pr55(Gag) in immature human immunodeficiency virus type 1 particles. *J Virol.* 2000; 74: 9381 - 9387
- 25 56. **Brody B. A., Rhee S. S., Hunter E.** Postassembly cleavage of a retroviral glycoprotein cytoplasmic domain removes a necessary incorporation signal and activates fusion activity. *J Virol.* 1994; 68: 4620 - 4627
- 30 57. **Ragheb J. A., Anderson W. F.** pH-independent murine leukemia virus ecotropic envelope-mediated cell fusion: Implications for the role of the R peptide and p12E TM in viral entry. *J Virol.* 1994; 68: 3220 - 3231
58. **Rein A, Mirro J, Haynes J. G., Ernst S. M., Nagashima K.** Function of the cytoplasmic domain of a retroviral transmembrane protein: p15E-p2E cleavage activates the membrane fusion capability of the murine leukemia virus env protein. *J Virol.* 1994; 68: 1773 - 1781
- 35 59. **Galili U, Shohet S. B., Kobrin E, Stults CL, Macher B. A.** Man, apes, and Old World monkeys differ from other mammals in the expression of alpha-galactosyl epitopes on nucleated cells. *J Biol Chem.* 1988; 263: 17755 - 17762
- 40 60. **Rother R. P., Fodor W. L., Springhorn J. P., Birks C. W., Setter E, Sandrin M. S., Squinto S. P., Rollins S. A.** A novel mechanism of retrovirus inactivation in human serum mediated by anti-alpha-galactosyl natural antibody. *J Exp Med.* 1995; 182: 1345 - 1355
- 45 61. **Takeuchi Y, Porter C, Strahan K, Preece A, Gustafsson K, Cosset F-L, Weiss R, Collins M.** Sensitisation of cells and retroviruses to human serum by alpha(1-3) galactosyltransferase. *Nature.* 1996; 379: 85 - 88
62. **Takeuchi Y, Liong S. H., Bieniasz P. D., Jager U, Porter C. D., Friedman T, McClure M. O., Weiss R. A.** Sensitization of rhabdo-, lenti-, and spumaviruses to human serum by galactosyl(alpha1-3)galactosylation. *J Virol.* 1997; 71: 6174 - 6178
- 50 63. **DePolo N. J., Harkleroad C. E., Bodner M, Watt A. T., Anderson C. G., Greengard J. S., Murthy K. K., Jr TWD, Jolly D. J.** The resistance of retroviral vectors produced from human cells to serum inactivation *in vivo* and *in vitro* is primate species dependent. *J Virol.* 1999; 73: 6708 - 6714
- 55 64. **Montefiori D. C., Cornell R. J., Zhou J. Y., Zhou J. T., Hirsch V. M., Johnson P. R.** Complement control proteins, CD46, CD55, and CD59, as common surface constituents of human and simian immunodeficiency viruses and possible targets for vaccine protection. *Virology.* 1994; 205: 82 - 92
- 60 65. **Lavillette D, Russell S. J., Cosset F-L.** Retargeting gene delivery by surface-engineered retroviral vector particles. *Current Opinion in Biotechnology.* 2001; 12: 461 - 466
66. **Russell S. J., Cosset F-L.** Modifying the Host Range Properties of Retroviral Vectors. *Journal of Gene Medicine.* 1999; 1: 300 - 311
- 65 67. **Donahue R. E., Sorrentino B. P., Hawley R. G., An D. S., Chen I. S., Wersto R. P.** Fibronectin fragment CH-296 inhibits apoptosis and enhances *ex vivo* gene transfer by murine retrovirus and human lentivirus vectors independent of viral tropism in nonhuman primate CD34+ cells. *Mol Ther.* 2001; 3: 359 - 367

68. **Pizzato M, Marlow S. A., Blair E. D., Takeuchi Y.** Initial binding of murine leukemia virus particles to cells does not require specific Env-receptor interaction. *J Virol.* 1999; 73: 8599 - 8611
 69. **Barnett A. L., Cunningham J. M.** Receptor binding transforms the surface subunit of the mammalian C-type retrovirus envelope protein from an inhibitor to an activator of fusion. *J Virol.* 2001; 75: 9096 - 9105
 70. **Lavillette D, Ruggieri A, Boson B, Maurice M, Cosset F-L.** Structural inter-relations between subdomains of the SU that regulate receptor-mediated transition between the fusion-inhibited and fusion-active conformations of the MLV glycoprotein submitted. 2002
 71. **Jinno-Oue A, Oue M, Ruscetti S. K.** A unique heparin-binding domain in the envelope protein of the neuropathogenic PVC-211 murine leukemia virus may contribute to its brain capillary endothelial cell tropism. *J Virol.* 2001; 75: 12439 - 12445
 72. **Klimstra W. B., Heidner HW, Johnston R. E.** The furin protease cleavage recognition sequence of Sindbis virus PE2 can mediate virion attachment to cell surface heparan sulfate. *J Virol.* 1999; 73: 6299 - 6306
 73. **Uckert W, Willmsky G, Pedersen F. S., Blankenstein T, Pedersen L.** RNA levels of human retrovirus receptors Pit1 and Pit2 do not correlate with infectibility by three retroviral vector pseudotypes. *Hum Gene Ther.* 1998; 9: 2619 - 2627
 74. **Lavillette D, Boson B, Russell S, Cosset F-L.** Membrane fusion by murine leukemia viruses is activated in cis or in trans by interactions of the receptor-binding domain with a conserved disulfide loop at the carboxy-terminus of the surface glycoproteins. *J of Virol.* 2001; 75: 3685 - 3695
 75. **Rodrigues P, Heard J. M.** Modulation of Phosphate Uptake and Amphotropic Murine Leukemia Virus Entry by Posttranslational Modifications of PIT-2. *J. Virol.* 1999; 73: 3789 - 3799
- Referencias Numeradas entre Paréntesis**
1. **Berlioz-Torrent, C., B. L. Shacklett, L. Erdtmann, L. Delamarre, I. Bouchaert, P. Sonigo, M. C. Dokhelar, and R. Benarous** 1999. Interactions of the cytoplasmic domains of human and simian retroviral transmembrane proteins with components of the clathrin adaptor complexes modulate intracellular and cell surface expression of envelope glycoproteins *J Virol.* 73: 1350 - 1361.
 2. **Brody, B. A., S. S. Rhee, and E. Hunter** 1994. Postassembly cleavage of a retroviral glycoprotein cytoplasmic domain removes a necessary incorporation signal and activates fusion activity *J Virol.* 68: 4620 - 4627.
 3. **Brody, B. A., S. S. Rhee, M. A. Sommerfelt, and E. Hunter** 1992. A viral protease-mediated cleavage of the transmembrane glycoprotein of Mason-Pfizer monkey virus can be suppressed by mutations within the matrix protein *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89: 3443 - 7.
 4. **Christodouloupoulos, I., and P. Cannon** 2001. Sequences in the cytoplasmic tail of the gibbon ape leukemia virus envelope protein that prevent its incorporation into lentivirus vectors *J Virol.* 75: 4129 - 38.
 5. **Collawn, J. F., A. Lai, D. Domingo, M. Fitch, S. Hatton, and I. S. Trowbridge** 1993. YTRF is the conserved internalization signal of the transferrin receptor, and a second YTRF signal at position 31-34 enhances endocytosis *J Biol Chem.* 268: 21686 - 21692.
 6. **Cosset, F.-L., Y. Takeuchi, J. Battini, R. Weiss, and M. Collins** 1995. High titer packaging cells producing recombinant retroviruses resistant to human serum *J. Virol.* 69: 7430 - 7436.
 7. **Cosson, P.** 1996. Direct interaction between the envelope and matrix proteins of HIV-1 *The Embo J.* 15: 5783 - 5788.
 8. **Delamarre, L., C. Pique, A. R. Rosenberg, V. Blot, M. P. Grange, I. L. Blanc, and M. C. Dokhelar** 1999. The YS-L-I tyrosine-based motif in the cytoplasmic domain of the human T-cell leukemia virus type 1 envelope is essential for cell-to-cell transmission. *J Virol.* 73: 9659 - 9663.
 9. **Denesvre, C., C. Carrington, A. Corbin, Y. Takeuchi, F.-L. Cosset, T. Schulz, M. Sitbon, and P. Sonigo** 1996. TM domain swapping of murine leukemia virus and human T-cell leukemia virus envelopes confers different infectious abilities despite similar incorporation into virions *J. Virol.* 70: 4380 - 4386.
 10. **Fielding, A., S. Chapel-Fernandes, M. Chadwick, F. Bullough, F.-L. Cosset, and S. Russell** 2000. A hyperfusogenic Gibbon ape leukemia virus envelope glycoprotein: targeting of a cytotoxic gene by ligand display *Human Gene Therapy.* 11: 817 - 826.

11. **Freed, E. O.** 1998. HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle *Virology*. 251: 1 - 15.
12. **Freed, E. O., and M. A. Martin** 1995. Virion incorporation of envelope glycoproteins with long but not short cytoplasmic tails is blocked by specific, single amino acid substitutions in the human immunodeficiency virus type 1 matrix *J Virol*. 69: 1984 - 1989.
13. **Grange, M., V. Blot, L. Delamarre, I. Bouchaert, A. Rocca, A. Dautry-Varsat, and M. Dokhelar** 2000. Identification of two intracellular mechanisms leading to reduced expression of oncoretrovirus envelope glycoproteins at the cell surface *J Virol*. 74: 11734 - 11743.
14. **Januszeski, M. M., P. M. Cannon, D. Chen, Y. Rozenberg, and W. F. Anderson** 1997. Functional analysis of the cytoplasmic tail of Moloney murine leukemia virus envelope protein *J Virol*. 71: 3613 - 9.
15. **Kiernan, R. E., and E. O. F. EO** 1998. Cleavage of the murine leukemia virus transmembrane env protein by human immunodeficiency virus type 1 protease: transdominant inhibition by matrix mutations *J Virol*. 72: 9621 - 7.
16. **Kim, F. J., I. Seiliez, C. Denesvre, D. Lavillette, F.-L. Cosset, and M. Sitbon** 2000. Definition of an amino-terminal domain of the human T-cell leukemia virus type 1 envelope surface unit which extends the fusogenic range of an ecotropic murine leukemia virus *Journal of Biological Chemistry*. 275: 23417 - 20.
17. **Li, M., C. Yang, and R. W. Compans** 2001. Mutations in the cytoplasmic tail of murine leukemia virus envelope protein suppress fusion inhibition by R peptide *J Virol*. 75: 2337 - 44.
18. **Lindwasser, O. W., and M. D. Resh** 2001. Multimerization of human immunodeficiency virus type 1 Gag promotes its localization to barges, raft-like membrane microdomains *J Virol*. 75: 7913 - 24.
19. **Lodge, R., L. Delamarre, J. P. Lalonde, J. Alvarado, D. A. Sanders, M. C. Dokhelar, E. A. Cohen, and G. Lemay** 1997. Two distinct oncornaviruses harbor an intracytoplasmic tyrosine-based basolateral targeting signal in their viral envelope glycoprotein *J Virol*. 71: 5696 - 702.
20. **Mangeot, P.-E., D. Nègre, B. Dubois, A. J. Winter, P. Leissner, M. Methali, D. Kaiserlian, F.-L. Cosset, and J.-L. Darlix** 2000. Development of minimal lentiviral vectors derived from simian immunodeficiency virus (SIVmac251) and their use for the gene transfer in human dendritic cells *J Virol*. 74: 8307 - 8315.
21. **Murakami, T., and E. O. Freed** 2000. Genetic evidence for an interaction between human immunodeficiency virus type 1 matrix and alpha-helix 2 of the gp41 cytoplasmic tail *J Virol*. 74: 3548 - 54.
22. **Naldini, L., U. Blömer, P. Gallay, D. Ory, R. Mulligan, F. H. Gage, I. M. Verma, and D. Trono** 1996. *In vivo* gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector *Science*. 272: 263 - 267.
23. **Nègre, D., G. Duisit, P.-E. Mangeot, P. Moullier, J.-L. Darlix, and F.-L. Cosset** 2002. Lentiviral vectors derived from simian immunodeficiency virus (SIV), p. 53 - 74. In D. Trono (ed.), *Current Topics in Microbiology and Immunology*, vol. 261.
24. **Nègre, D., P. Mangeot, G. Duisit, S. Blanchard, P. Vidalain, P. Leissner, A. Winter, C. Rabourdin-Combe, M. Mehtali, P. Moullier, J.-L. Darlix, and F.-L. Cosset** 2000. Characterization of novel safe lentiviral vectors derived from simian immunodeficiency virus (SIVmac251) that efficiently transduce mature human dendritic cells *Gene Ther*. 7: 1613 - 1623.
25. **Nguyen, D. H., and J. E. Hildreth** 2000. Evidence for budding of human immunodeficiency virus type 1 selectively from glycolipid-enriched membrane lipid rafts *J Virol*. 74: 3264 - 72.
26. **Ono, A., and E. O. Freed** 2001. Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release *PNAS*. 98: 13925 - 13930.
27. **Ott, D., R. Friedrich, and A. Rein** 1990. Sequence analysis of amphotropic and 10A1 murine leukemia virus: close relationship to mink cell focus forming viruses. *J Virol*. 64: 757 - 766.
28. **Overbaugh, J., A. D. Miller, and M. V. Eiden** 2001. Receptors and Entry Cofactors for Retroviruses Include Single and Multiple Transmembrane-Spanning Proteins as well as Newly Described Glycophosphatidylinositol-Anchored and Secreted Proteins *Microbiol Mol Biol Rev*. 65: 371 - 89.
29. **Pickl, W. F., F. X. Pimentel-Muinos, and B. Seed** 2001. Lipid rafts and pseudotyping *J Virol*. 75: 7175 - 83.
30. **Ragheb, J. A., and W. F. Anderson** 1994. pH-independent murine leukemia virus ecotropic envelope-mediated cell fusion: Implications for the role of the R peptide and p12E TM in viral entry. *J Virol*. 68: 3220 - 3231.

31. **Rasko, J. E., J. L. Battini, R. J. Gottschalk, I. Mazo, and A. D. Miller** 1999. The RD114/simian type D retrovirus receptor is a neutral amino acid transporter *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96: 2129 - 2134.

32. **Reeves, R. H., and S. J. O'Brien** 1984. Molecular genetic characterisation of the RD114 gene family of endogenous feline retroviral sequences *J. Virol.* 52: 164 - 171.

33. **Rein, A., J. Mirro, J. G. Haynes, S. M. Ernst, and K. Nagashima** 1994. Function of the cytoplasmic domain of a retroviral transmembrane protein: p15E-p2E cleavage activates the membrane fusion capability of the murine leukemia virus env protein *J Virol.* 68: 1773 - 1781.

34. **Salmon, P., D. Nègre, D. Trono, and F.-L. Cosset** 2000. Achimeric GALV-derived envelope glycoprotein harboring the cytoplasmic tail of MLV envelope efficiently pseudotypes HIV-1 vectors *J Gen Med.* 2 (sup):23.

35. **Sandrin, V., B. Boson, P. Salmon, W. Gay, D. Nègre, R. L. Grand, D. Trono, and F.-L. Cosset** 2002. Lentiviral vectors pseudotyped with a modified RD114 envelope glycoprotein show increased stability in sera and augmented transduction of primary lymphocytes and CD34+ cells derived from human and non-human primates *Blood. in press.*

36. **Stitz, J., C. Buchholz, M. Engelstadter, W. Uckert, U. Bloemer, I. Schmitt, and K. Cichutek** 2000. Lentiviral vectors pseudotyped with envelope glycoproteins derived from gibbon ape leukemia virus and murine leukemia virus 10A1 *Virology.* 273: 16 - 20.

37. **Swanstrom, R., and J. W. Wills** 1997. Synthesis, assembly, and processing of viral proteins, p. 263 - 334. In J. M. Coffin, S. H. Hughes, and H. E. Varmus (eds), *Retroviruses. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.*

38. **Tailor, C. S., A. Nouri, Y. Zhao, Y. Takeuchi, and D. Kabat** 1999. A sodium-dependent neutral-amino-acid transporter mediates infections of feline and baboon endogenous retroviruses and simian type D retroviruses *J Virol.* 73: 4470 - 4474.

39. **Takeuchi, Y., F. L. Cosset, P. J. Lachmann, H. Okada, R. A. Weiss, and M. K. L. Collins** 1994. Type C retrovirus inactivation by human complement is determined by both the viral genome and producer cell *J. Virol.* 68: 8001 - 8007.

40. **Takeuchi, Y., R. G. Vile, G. Simpson, B. O'Hara, M. K. L. Collins, and R. A. Weiss** 1992b. Feline leukemia virus subgroup B uses the same cell surface receptor as gibbon ape leukemia virus *J Virol.* 66: 1219 - 1222.

41. **Vincent, M. J., L. R. Melsen, A. S. Martin, and R. W. Compans** 1999. Intracellular interaction of simian immunodeficiency virus Gag and Env proteins *J Virol.* 73: 8138 - 44.

42. **Wyma, D. J., A. Kotov, and C. Aiken** 2000. Evidence for a stable interaction of gp41 with Pr55(Gag) in immature human immunodeficiency virus type 1 particles *J Virol.* 74: 9381 - 7.

43. **Yang, C., and R. W. Compans** 1997. Analysis of the murine leukemia virus Rpeptide: delineation of the molecular determinants which are important for its fusion inhibition activity *J Virol.* 71: 8490 - 8496.

Yee, J. K., T. Friedmann, and J. C. Burns 1994. Generation of high-titer pseudotyped retroviral vectors with very broad host range *Methods Cell Biol.* 43: 99 - 112.

Referencias Adicionales

Akkina, Walton, Chen, Li, Planelles, Chen, "High-efficiency gene transfer into CD34+ cells with a human immunodeficiency virus type 1-based retroviral vector pseudotyped with vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein G", *J. Virol.*, 70: 2581 - 2585, 1996.

Almendro y colaboradores, "Cloning of the human platelet endothelial cell adhesion molecule-1 promoter and its tissue-specific expression. Structural and functional characterization", *J. Immunol.*, 157(12): 5411 - 5421, 1996.

An, Wersto, Agricola, Metzger, Lu, Amado, Chen, Donahue, "Marking and gene expression by a lentivirus vector in transplanted human and nonhuman primate CD34(+) cells", *J. Virol.*, 74: 1286 - 1295, 2000.

Angel, Bauman, Stein, Dellus, Rahmsdorf, and Herrlich, "12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate Induction of the Human Collagenase Gene is Mediated by an Inducible Enhancer Element Located in the 5' Flanking Region", *Mol. Cell. Biol.*, 7: 2256, 1987a.

Angel, Imagawa, Chiu, Stein, Imbra, Rahmsdorf, Jonat, Herrlich, and Karin, "Phorbol Ester-Inducible Genes Contain a Common cis Element Recognized by a TPA-Modulated Trans-acting Factor", *Cell*, 49: 729, 1987b

Arrighi, Hauser, Chapuis, Zubler, Kindler, "Long-term culture of human CD34(+) progenitors with FLT3-ligand, thrombopoietin, and stem cell factor induces extensive amplification of a CD34(-)CD14(-) and CD34(-)CD14(+) dendritic cell precursor", *Blood*, 93: 2244 - 2252, 1999.

Atchison and Perry, "Tandem Kappa Immunoglobulin Promoters are Equally Active in the Presence of the Kappa Enhancer: Implications for Model of Enhancer Function", *Cell*, 46: 253, 1986.

Atchison and Perry, "The Role of the Kappa Enhancer and its Binding Factor NF-kappa B in the Developmental Regulation of Kappa Gene Transcription", *Cell*, 48: 121, 1987.

Banerji y colaboradores, "Expression of a Beta-Globin Gene is Enhanced by Remote SV40DNA Sequences", *Cell*, 27: 299, 1981.

Banerji, Olson; and Schaffner, "A lymphocyte-specific cellular enhancer is located downstream of the joining region in immunoglobulin heavy-chain genes", *Cell*, 35: 729, 1983.

Berkhout, Silverman, and Jeang, "Tat Trans-activates the Human Immunodeficiency Virus Through a Nascent RNA Target", *Cell*, 59: 273, 1989.

Bhatia, Bonnet, Kapp, Wang, Murdoch, Dick, "Quantitative analysis reveals expansion of human hematopoietic repopulating cells after short-term *ex vivo* culture", *J. Exp. Med.*, 186: 619 - 624, 1997.

Blanar, Baldwin, Flavell, and Sharp, "A gamma-interferon-induced factor that binds the interferon response sequence of the MHC class I gene, H-2Kb", *EMBO J.*, 8: 1139, 1989.

Blomer, Naldini, Kafri, Trono, Verma, Gage, "Highly efficient and sustained gene transfer in adult neurons with a lentivirus vector", *J. Virol.*, 71: 6641 - 6649, 1997.

Bodine and Ley, "An enhancer element lies 3' to the human alpha gamma globin gene", *EMBO J.*, 6: 2997, 1987.

Boshart, Weber, Jahn, Dorsch-Hasler, Fleckenstein, and Schaffner, "A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus", *Cell*, 41: 521, 1985.

Bosze, Thiesen, and Charnay, "A transcriptional enhancer with specificity for erythroid cells is located in the long terminal repeat of the Friend murine leukemia virus", *EMBO J.*, 5: 1615, 1986.

Braddock, Chambers, Wilson, Esnouf, Adams, Kingsman, and Kingsman, "HIV-1 Tat activates presynthesized RNA in the nucleus", *Cell*, 58: 269, 1989.

Bray, Prasad, Dubay, Hunter, Jeang, Rekosh, Hammarskjöld, "A small element from the Mason-Pfizer monkey virus genome makes human immunodeficiency virus type 1 expression and replication Rev-independent", *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 1256 - 60, 1994.

Brown, Tiley, Cullen, "Efficient polyadenylation within the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat requires flanking U3-specific sequences", *J. Virol.*, 65: 3340 - 3343, 1991.

Bulla and Siddiqui, "The hepatitis B virus enhancer modulates transcription of the hepatitis B virus surface-antigen gene from an internal location", *J. Virol.*, 62: 1437, 1986.

Campbell and Villarreal, "Functional analysis of the individual enhancer core sequences of polyoma virus: cell-specific uncoupling of DNA replication from transcription", *Mol. Cell. Biol.*, 8: 1993, 1988.

Campere and Tilghman, "Postnatal repression of the alpha-fetoprotein gene is enhancer independent", *Genes and Dev.*, 3: 537, 1989.

Campo, Spandidos, Lang, Wilkie, "Transcriptional control signals in the genome of bovine papilloma virus type 1", *Nature*, 303: 77, 1983.

Carbonelli y colaboradores, "A plasmid vector for isolation of strong promoters in *E. coli*", *FEMS Microbiol. Lett.* 177(1): 75 - 82, 1999.

Case, Price, Jordan, Yu, Wang, Bauer, Haas, Xu, Stripecke, Naldini, Kohn, Crooks, "Stable transduction of quiescent CD34(+)CD38(-) human hematopoietic cells by HIV-1 based lentiviral vectors", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 2988 - 2993, 1999.

Celander and Haseltine, "Glucocorticoid Regulation of Murine Leukemia Virus Transcription Elements is Specified by Determinants Within the Viral Enhancer Region", *J. Virology*, 61: 269, 1987.

Celander, Hsu, and Haseltine, "Regulatory Elements Within the Murine Leukemia Virus Enhancer Regions Mediate Glucocorticoid Responsiveness", *J. Virology*, 62: 1314, 1988.

Chandler, Maler, and Yamamoto, "DNA Sequences Bound Specifically by Glucocorticoid Receptor *in vitro* Render a Heterologous Promoter Hormone Responsive *in vivo*", *Cell*, 33:489, 1983.

Chandler y colaboradores, "RNA splicing specificity determined by the coordinated action of RNA recognition motifs in SR proteins", *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94(8): 3596 - 3601, 1997.

Chang, Erwin, and Lee, "Glucose-regulated Protein (GRP94 and GRP78) Genes Share Common Regulatory Domains and are Coordinately Regulated by Common Trans-acting Factors", *Mol. Cell. Biol.*, 9: 2153, 1989.

Charneau, Mirambeau, Roux, Paulous, Buc, Clavel, "HIV-1 reverse transcription: a termination step at the center of the genome", *J. Mol. Biol.* 241: 651 - 662, 1994.

Chatterjee, Lee, Rentoumis, and Jameson, "Negative Regulation of the Thyroid-Stimulating Hormone Alpha Gene by Thyroid Hormone: Receptor Interaction Adjacent to the TATA Box", *Proc Natl. Acad Sci. U.S.A.*, 86: 9114, 1989.

Chen and Okayama, "High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA", *Mol. Cell. Biol.* 7: 2745 - 2752, 1987

Cherrington and Ganem, "Regulation of polyadenylation in human immunodeficiency virus (HIV): contributions of promoter proximity and upstream sequences", *Embo. J.*, 11: 1513 - 1524, 1992.

Choi, Chen, Kriegler, and Roninson, "An altered pattern of cross-resistance in multi-drug-resistant human cells results from spontaneous mutations in the *mdr-1* (p-glycoprotein) gene", *Cell*, 53: 519, 1988.

Cocea, "Duplication of a region in the multiple cloning site of a plasmid vector to enhance cloning-mediated addition of restriction sites to a DNA fragment", *Biotechniques*, 23: 814 - 816, 1997.

Cohen, Walter, and Levinson, "A Repetitive Sequence Element 3' of the Human c-Ha-ras1 Gene Has Enhancer Activity", *J. Cell. Physiol.*, 5: 75, 1987.

Corbeau, y colaboradores, *PNAS* (U.S.A.), 93(24): 14070 - 14075, 1996.

Costa, Lai, Grayson, and Damell, "The Cell-Specific Enhancer of the Mouse Transthyretin (Prealbumin) Gene Binds a Common Factor at One Site and a Liver-Specific Factor(s) at Two Other Sites", *Mol. Cell. Biol.*, 8: 81, 1988.

Cripe, Haugen, Turk, Tabatabai, Schmid, Durst, Gissmann, Roman, and Turek, "Transcriptional Regulation of the Human Papilloma Virus-16 E6-E7 Promoter by a Keratinocyte-Dependent Enhancer, and by Viral E2 Trans-Activator and Repressor Gene Products: Implications for Cervical Carcinogenesis", *EMBO J.*, 6: 3745, 1987.

Culotta and Hamer, "Fine Mapping of a Mouse Metallothionein Gene Metal-Response Element", *Mol. Cell. Biol.*, 9: 1376, 1989.

Dandolo, Blangy, and Kamen, "Regulation of Polyma Virus Transcription in Murine Embryonal Carcinoma Cells", *J. Virology*, 47: 55, 1983.

Das, Klaver, Klasens, van Wamel, "A conserved hairpin motif in the R-U5 region of the human immunodeficiency virus type 1 RNA genome is essential for replication", *J. Virol.* 71: 2346 - 2356.

Dao, Hannum, Kohn, Nolte, "FLT3 ligand preserves the ability of human CD34+ progenitors to sustain long-term hematopoiesis in immune-deficient mice after *ex vivo* retroviral-mediated transduction", *Blood*, 89: 446 - 456, 1997.

Dao, Hashino, Kato, Nolte, "Adhesion to fibronectin maintains regenerative capacity during *ex vivo*, culture and transduction of human hematopoietic stem and progenitor cells", *Blood*, 92: 4612 - 4621, 1998.

Deschamps, Meijlink, and Verma, "Identification of a Transcriptional Enhancer Element Upstream From the Proto-Oncogene *Fos*", *Science*, 230: 1174, 1985.

DeVilliers, Schaffner, Tyndall, Lupton, and Kamen, "Polyoma Virus DNA Replication Requires an Enhancer", *Nature*, 312: 242, 1984.

DeZazzo, Kilpatrick, Imperiale, "Involvement of long terminal repeat U3 sequences overlapping the transcription control region in human immunodeficiency virus type 1 mRNA 3' end formation", *Mol. Cell. Biol.*, 11: 1624 - 1630, 1991.

Donello, Loeb, Hope, "Woodchuck hepatitis virus contains a tripartite posttranscriptional regulatory element", *J. Virol.*, 72: 5085 - 5092, 1998.

Dorrell, Gan, Pereira, Hawley, Dick, "Expansion of human cord blood CD34(+)CD38(-) cells in *ex vivo* culture during retroviral transduction without a corresponding increase in SCID repopulating cell (SRC) frequency: dissociation of SRC phenotype and function", *Blood*, 95: 102 - 110, 2000.

Dull, Zufferey, Kelly, Mandel, Nguyen, Trono, Naldini, "A third generation lentivirus vector with a conditional packaging system", *J. Virol.*, 72: 8463 - 8471, 1998.

Edbrooke, Burt, Cheshire, and Woo, "Identification of cis-acting sequences responsible for phorbol ester induction of human serum amyloid A gene expression via a nuclear-factor-kappa β -like transcription factor", *Mol. Cell. Biol.*, 9: 1908, 1989.

Edlund, Walker, Barr, and Rutter, "Cell-specific expression of the rat insulin gene: evidence for role of two distinct 5' flanking elements", *Science*, 230: 912, 1985.

Fechheimer, Boylan, Parker, Siskin, Patel and Zimmer, "Transfection of mammalian cells with plasmid DNA by scrape loading and sonication loading", *Proc Nat'l. Acad. Sci. USA* 84: 8463 - 8467, 1987

Feng and Holland, "HIV-I Tat Trans-Activation Requires the Loop Sequence Within Tar", *Nature*, 334: 6178, 1988.

Firak and Subramanian, "Minimal Transcription Enhancer of Simian Virus 40 is a 74-Base-Pair Sequence that Has Interacting Domains", *Mol. Cell. Biol.*, 6: 3667, 1986.

Foecking and Hofstetter, "Powerful and Versatile Enhancer-Promoter Unit for Mammalian Expression Vectors", *Gene*, 45(1): 101 - 105, 1986.

Froehler, Ng, Matteucci, "Synthesis of DNA via deoxynucleoside H-phosphonate intermediates." *Nuc. Acids Res.* 14: 5399 - 407, 1986.

Fujita, Shibuya, Hotta, Yamanishi, and Taniguchi, "Interferon-Beta Gene Regulation: Tandemly Repeated Sequences of a Synthetic 6-bp Oligomer Function as a Virus-Inducible Enhancer", *Cell*, 49: 357, 1987.

Gilles, Morris, Oi, and Tonegawa, "A tissue-specific transcription enhancer element is located in the major intron of a rearranged immunoglobulin heavy-chain gene", *Cell*, 33: 717, 1983.

Gilmartin, Fleming, Oetjen, "Activation of HIV-1 pre-mRNA 3' processing *in vitro* requires both an upstream element and TAR", *Embo. J.*, 11: 4419 - 4428, 1992.

Gloss, Bernard, Seedorf, and Klock, "The Upstream Regulatory Region of the Human Papilloma Virus-16 Contains an E2 Protein-Independent Enhancer Which is Specific for Cervical Carcinoma Cells and Regulated by Glucocorticoid Hormones", *EMBO J.*, 6: 3735, 1987.

Godbout, Ingram, and Tilghman, "Fine-Structure Mapping of the Three Mouse Alpha-Fetoprotein Gene Enhancers", *Mol. Cell. Biol.*, 8: 1169, 1988.

Goodbourn, Burstein, and Maniatis, "The Human Beta-Interferon Gene Enhancer is Under Negative Control", *Cell*, 45: 601, 1986.

Goodbourn and Maniatis, "Overlapping Positive and Negative Regulatory Domains of the Human β -Interferon Gene", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 1447, 1988.

Gopal, "Gene transfer method for transient gene expression, stable transformation, and cotransformation of suspension cell cultures", *Mol. Cell. Biol.* 5: 1188 - 1190, 1985.

Gossen and Bujard, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 89: 5547 - 5551, 1992.

Graham and Van Der Eb, "A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA", *Virology* 52: 456 - 467, 1973

Greco and Dachs, "Gene directed enzyme/prodrug therapy of cancer: historical appraisal and future prospectives", *J. Cell. Phys.* 187: 22 - 36, 2001

Greene, Bohnlein, and Ballard, "HIV-1, and Normal T-Cell Growth: Transcriptional Strategies and Surprises", *Immunology Today*, 10: 272, 1989

Grosschedl and Baltimore, "Cell-Type Specificity of Immunoglobulin Gene Expression is Regulated by at Least Three DNA Sequence Elements", *Cell*, 41: 885, 1985.

Haslinger and Karin, "Upstream Promoter Element of the Human Metallothionein-II Gene Can Act Like an Enhancer Element", *Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82: 8572, 1985.

Hauber and Cullen, "Mutational Analysis of the Trans-Activation-Responsive Region of the Human Immunodeficiency Virus Type I Long Terminal Repeat", *J. Virology*, 62: 673, 1988.

Hen, Borrelli, Fromental, Sassone-Corsi, and Chambon, "A Mutated Polyoma Virus Enhancer Which is Active in Undifferentiated Embryonal Carcinoma Cells is not Repressed by Adenovirus-2 E1A Products", *Nature*, 321: 249, 1986.

Hensel, Meichle, Pfizenmaier, and Kronke, "PMA-Responsive 5' Flanking Sequences of the Human TNF Gene", *Lymphokine Res.*, 8: 347, 1989.

Herr and Clarke, "The SV40 Enhancer is Composed of Multiple Functional Elements That Can Compensate for One Another", *Cell*, 45: 461, 1986.

Hirochika, Browker, and Chow, "Enhancers and Trans-Acting E2 Transcriptional Factors of Papilloma Viruses", *J. Virol.*, 61: 2599, 1987.

Hirsch, Gaugler, Deagostini-Bauzin, Bally-Cuif, and Gordis, "Identification of Positive and Negative Regulatory Elements Governing Cell-Type-Specific Expression of the Neural-Cell-Adhesion-Molecule Gene", *Mol. Cell. Biol.*, 10: 1959, 1990.

Holbrook, Gulino, and Ruscelli, "cis-Acting Transcriptional Regulatory Sequences in the Gibbon Ape Leukemia Virus (GALV) Long Terminal Repeat", *Virology*, 157: 211, 1987.

Horlick and Benfield, "The upstream muscle-specific enhancer of the rat muscle creatine kinase gene is composed of multiple elements", *Mol. Cell. Biol.*, 9: 2396, 1989.

Huang, Ostrowski, Berard, and Hagar, "Glucocorticoid regulation of the ha-musv p21 gene conferred by sequences from mouse mammary tumor virus", *Cell*, 27: 245, 1981.

Hug, Costas, Staeheli, Aebi, and Weissmann, "Organization of the Murine Mx Gene and Characterization of its Interferon- and Virus-Inducible Promoter", *Mol. Cell. Biol.*, 8: 3065, 1988.

Hwang, Lim, and Chae, "Characterization of the S-Phase-Specific Transcription Regulatory Elements in a DNA-Replication-Independent Testis-Specific H2B (TH2B) Histone Gene", *Mol. Cell. Biol.*, 10: 585, 1990.

Imagawa, Chiu, and Karin, "Transcription Factor AP-2 Mediates Induction by Two Different Signal-Transduction Pathways: Protein Kinase C and cAMP", *Cell*, 51: 251, 1987.

Imbra and Karin, "Phorbol Ester Induces the Transcriptional Stimulatory Activity of the SV40 Enhancer", *Nature*, 323: 555, 1986.

Imler, Lemaire, Wasvlyk, and Waslyk, "Negative Regulation Contributes to Tissue Specificity of the Immunoglobulin Heavy-Chain Enhancer", *Mol. Cell. Biol.*, 7: 2558, 1987.

Imperiale and Nevins, "Adenovirus 5 E2 Transcription Unit: an E1A-Inducible Promoter with an Essential Element that Functions Independently of Position or Orientation", *Mol. Cell. Biol.*, 4: 875, 1984.

Jakobovits, Smith, Jakobovits, and Capon, "A Discrete Element 3' of Human Immunodeficiency Virus 1 (HIV-1) and HIV-2 mRNA Initiation Sites Mediates Transcriptional Activation by an HIV Trans-Activator", *Mol. Cell. Biol.*, 8: 2555, 1988.

Jameel and Siddiqui, "The Human Hepatitis B Virus Enhancer Requires Transacting Cellular Factor(s) for Activity", *Mol. Cell. Biol.*, 6: 710, 1986.

Jaynes, Johnson, Buskin, Gartside, and Hauschka, "The Muscle Creatine Kinase Gene is Regulated by Multiple Upstream Elements, Including a Muscle-Specific Enhancer", *Mol. Cell. Biol.*, 8: 62, 1988.

Johnson, Wold, and Hauschka, "Muscle creatine kinase sequence elements regulating skeletal and cardiac muscle expression in transgenic mice", *Mol. Cell. Biol.*, 9: 3393, 1989.

Kadesch and Berg, "Effects of the Position of the Simian Virus 40 Enhancer on Expression of Multiple Transcription Units in a Single Plasmid", *Mol. Cell. Biol.*, 6: 2593, 1986.

Kafri, y colaboradores, "Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors", *Nat. Genetics*, 17: 314 - 317, 1997.

Karin, Haslinger, Heguy, Dietlin, and Cooke, "Metal-Responsive Elements Act as Positive Modulators of Human Metallothionein-IIA Enhancer Activity", *Mol. Cell. Biol.*, 7: 606, 1987.

Katinka, Yaniv, Vasseur, and Blangy, "Expression of Polyoma Early Functions in Mouse Embryonal Carcinoma Cells Depends on Sequence Rearrangements in the Beginning of the Late Region", *Cell*, 20: 393, 1980.

Kawamoto, Makino, Niw, Sugiyama, Kimura, Anemura, Nakata, and Kakunaga, "Identification of the Human Beta-Actin Enhancer and its Binding Factor", *Mol. Cell. Biol.*, 8: 267, 1988.

Kiledjian, Su, Kadesch, "Identification and characterization of two functional domains within the murine heavy-chain enhancer", *Mol. Cell. Biol.*, 8: 145, 1988.

Klages, Zufferey, Trono, "A stable system for the high-titer production of multiply aattenuated lentiviral vectors", *Mol. Ther.* 2: 170 - 176, 2000.

Klamut, Gangopadyhay, Worton, and Ray, "Molecular and Functional Analysis of the Muscle-Specific Promoter Region of the Duchenne Muscular Dystrophy Gene", *Mol. Cell. Biol.*, 10: 193, 1990.

Klein y colaboradores, "High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells", *Nature*, 327: 70 - 73, 1987.

Koch, Benoist, and Mathis, "Anatomy of a new β -cell-specific enhancer", *Mol. Cell. Biol.*, 9: 303, 1989.

Kohn, Nolte, Weinthal, Bahner, Yu, Lilley, Crooks, "Toward gene therapy for Gaucher disease", *Hum. Gene Ther.*, 2: 101 - 105, 1991.

Kotsopoulou, Kim, Kingsman, Kingsman, Mitrophanous, "A Rev-independent human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-based vector that exploits a codon-optimized HIV-1 gag-pol gene", *J. Virol.* 74: 4839 - 52, 2000.

Kraus y colaboradores, "Alternative promoter usage and tissue specific expression of the mouse somatostatin receptor 2 gene", *FEBS Lett.*, 428(3): 165 - 170, 1998.

Kriegler and Botchan, "A retrovirus LTR contains a new type of eukaryotic regulatory element", In: Eukaryotic Viral Vectors, Gluzman (ed.), Cold Spring Harbor, *Cold Spring Harbor Laboratory*, NY, 1982.

Kriegler y colaboradores, "Promoter substitution and enhancer augmentation increases the penetrance of the sv40 a gene to levels comparable to that of the harvey murine sarcoma virus ras gene in morphologic transformation", In: Gene Expression, Alan Liss (Ed.), *Hamer and Rosenberg*, New York, 1983.

Kriegler y colaboradores, "Viral Integration and Early Gene Expression Both Affect the Efficiency of SV40 Transformation of Murine Cells: Biochemical and Biological Characterization of an SV40 Retrovirus", In: Cancer Cells 2/Oncogenes and Viral Genes, Van de Woude y colaboradores (eds), Cold Spring Harbor, *Cold Spring Harbor Laboratory*, 1984.

Kriegler, Perez, Defay, Albert and Liu, "A Novel Form of TNF/Cachectin Is a Cell-Surface Cytotoxix Transmembrane Protein: Ramifications for the Complex Physiology of TNF", *Cell*, 53: 45, 1988.

Kuhl, De La Fuente, Chaturvedi, Parinool, Ryals, Meyer, and Weissman, "Reversible Silencing of Enhancers by Sequences Derived From the Human IFN-alpha Promoter", *Cell*, 50: 1057, 1987.

Kunz, Zimmerman, Heisig, and Heinrich, "Identification of the Promoter Sequences Involved in the Interleukin-6-Dependent Expression of the Rat Alpha-2-Macroglobulin Gene", *Nucl. Acids Res.*, 17: 1121, 1989.

Lareyre y colaboradores, "A 5-kilobase pair promoter fragment of the murine epididymal retinoic acid-binding protein gene drives the tissue-specific, cell-specific, and androgen-regulated expression of a foreign gene in the epididymis of transgenic mice", *J Biol Chem.*, 274(12): 8282 - 8290, 1999.

Larsen, Harney, and Moore, "Repression medaites cell-type-specific expression of the rat growth hormone gene", *Proc Natl. Acad. Sci. USA.*, 83: 8283, 1986.

Laspia, Rice, and Mathews, "HIV-1 Tat protein increases transcriptional initiation and stabilizes elongation", *Cell*, 59: 283, 1989.

Latimer, Berger, and Baumann, "Highly conserved upstream regions of the alpha..sub.1-antitrypsin gene in two mouse species govern liver-specific expression by different mechanisms", *Mol. Cell. Biol.*, 10: 760, 1990.

- Lee, Mulligan, Berg, and Ringold, "Glucocorticoids Regulate Expression of Dihydrofolate Reductase cDNA in Mouse Mammary Tumor Virus Chimaeric Plasmids", *Nature*, 294: 228, 1981.
- Lee y colaboradores, "Activation of beta3-adrenoceptors by exogenous dopamine to lower glucose uptake into rat adipocytes", *J Auton Nerv Syst.* 74(2-3): 86 - 90, 1997.
- Levenson y colaboradores, "Internal ribosomal entry site-containing retroviral vectors with green fluorescent protein and drug resistance markers", *Human Gene Therapy*, 9: 1233 - 1236, 1998.
- Levinson, Khoury, VanDeWoude, and Gruss, "Activation of SV40 Genome by 72-Base-Pair Tandem Repeats of Moloney Sarcoma Virus", *Nature*, 295: 79, 1982. Lewis and Emerman, "Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus", *J. Virol.*, 68: 510 - 516, 1994.
- Lin, Cross, Halden, Dragos, Toledano, and Leonard, "Delineation of an enhancerlike positive regulatory element in the interleukin-2 receptor alpha.-chain gene", *Mol. Cell. Biol.*, 10: 850, 1990.
- Luria, Gross, Horowitz, and Givol, "Promoter Enhancer Elements in the Rearranged Alpha-Chain Gene of the Human T-Cell Receptor", *EMBO J.*, 6: 3307, 1987.
- Lusky, Berg, Weiher, and Botchan, "Bovine Papilloma Virus Contains an Activator of Gene Expression at the Distal End of the Early Transcription Unit", *Mol. Cell. Biol.* 3: 1108, 1983.
- Lusky and Botchan, "Transient Replication of Bovine Papilloma Virus Type 1 Plasmids: cis and trans Requirements", *Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 83: 3609, 1986.
- Majors and Varmus, "A Small Region of the Mouse Mammary Tumor Virus Long Terminal Repeat Confers Glucocorticoid Hormone Regulation on a Linked Heterologous Gene", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 80: 5866, 1983.
- Marthas y colaboradores *J. Virol.*, 67: 6047 - 6055, 1993.
- Mazurier, Moreau-Gaudry, Maguer-Satta, Salesse, Pigeonnier-Lagarde, Ged, Belloc, Lacombe, Mahon, Reiffers, de Verneuil, "Rapid analysis and efficient selection of human transduced primitive hematopoietic cells using the humanized S65T green fluorescent protein", *Gene Ther.*, 5: 556 - 562, 1998.
- McNeill, Sanchez, Gray, Chesterman, and Sleight, "Hyperinducible Gene Expression From a Metallothionein Promoter Containing Additional Metal-Responsive Elements", *Gene*, 76: 81, 1989.
- Miksicek, Heber, Schmid, Danesch, Posseckert, Beato, and Schutz, "Glucocorticoid Responsiveness of the Transcriptional Enhancer of Moloney Murine Sarcoma Virus", *Cell*, 46: 203, 1986.
- Miyoshi, Smith, Mosier, Verma, Torbett, "Transduction of human CD34+ cells that mediate long-term engraftment of NOD/SCID mice by HIV vectors", *Science*, 283: 682 - 686, 1999.
- Mizushima and Nagata, "pEF-BOS, a powerful mammalian expression vector", *Nucleic Acids Res.*, 18: 5322, 1990.
- Mordacq and Linzer, "Co-localization of Elements Required for Phorbol Ester Stimulation and Glucocorticoid Repression of Proliferin Gene Expression", *Genes and Dev.*, 3: 760, 1989.
- Moreau, Hen, Wasyluk, Everett, Gaub, and Chambon, "The SV40 base-repair repeat has a striking effect on gene expression both in sv40 and other chimeric recombinants", *Nucl. Acids Res.*, 9: 6047, 1981.
- Muesing y colaboradores, *Cell*, 48: 691, 1987.
- Naldini, Blomer, Gallay, Ory, Mulligan, Gage, Verma, Trono, "In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector", *Science*, 272: 263 - 267, 1996a.
- Naldini, Blomer, Gage, Trono, Verma, "Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 11382 - 11388, 1996b.
- Naldini, "Lentiviruses as gene transfer agents for delivery to non-dividing cells", *Curr. Opin. Biotechnol.* 9: 457 - 463, 1998.
- Ng, Gunning, Liu, Leavitt, and Kedes, "Regulation of the Human Beta-Actin Promoter by Upstream and Intron Domains", *Nuc. Acids Res.*, 17: 601, 1989.
- Nomoto y colaboradores, "Cloning and characterization of the alternative promoter regions of the human LIMK2 gene responsible for alternative transcripts with tissue-specific expression", *Gene*, 236(2): 259 - 271, 1999.

Omitz, Hammer, Davison, Brinster, and Palmiter, “Promoter and enhancer elements from the rat elastase i gene function independently of each other and of heterologous enhancers”, *Mol. Cell. Biol.* 7: 3466, 1987.

Ondek, Sheppard, and Herr, “Discrete Elements Within the SV40 Enhancer Region Display Different Cell-Specific Enhancer Activities”, *EMBO J.*, 6: 1017, 1987.

Ory y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93: 11400 - 11406, 1996.

Palmiter, Chen, and Brinster, “Differential regulation of metallothionein-thymidine kinase fusion genes in transgenic mice and their offspring”, *Cell*, 29: 701, 1982.

Pech, Rao, Robbins, and Aaronson, “Functional identification of regulatory elements within the promoter region of platelet-derived growth factor 2”, *Mol. Cell. Biol.*, 9: 396, 1989.

Perez-Stable and Constantini, “Roles of fetal γ -globin promoter elements and the adult β -globin 3' enhancer in the stage-specific expression of globin genes”, *Mol. Cell. Biol.*, 10: 1116, 1990.

Piacibello, Sanavio, Severino, Dane, Gammaitoni, Fagioli, Perissinotto, Cavalloni, Kollet Lapidot, Aglietta, “Engraftment in nonobese diabetic severe combined immunodeficient mice of human CD34(+) cord blood cells after *ex vivo* expansion: evidence for the amplification and self-renewal of repopulating stem cells”, *Blood*, 93: 3736 - 3749, 1999.

Picard and Schaffner, “A Lymphocyte-Specific Enhancer in the Mouse Immunoglobulin Kappa Gene”, *Nature*, 307: 83, 1984.

Pinkert, Omitz, Brinster, and Palmiter, “An albumin enhancer located 10 kb upstream functions along with its promoter to direct efficient, liver-specific expression in transgenic mice”, *Genes and Dev.*, 1: 268, 1987.

Ponta, Kennedy, Skroch, Hynes, and Groner, “Hormonal Response Region in the Mouse Mammary Tumor Virus Long Terminal Repeat Can Be Dissociated From the Proviral Promoter and Has Enhancer Properties”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82: 1020, 1985.

Porton, Zaller, Lieberson, and Eckhardt, “Immunoglobulin heavy-chain enhancer is required to maintain transfected .gamma.2a gene expression in a pre-b-cell line”, *Mol. Cell. Biol.*, 10: 1076, 1990.

Potter y colaboradores, “Enhancer-dependent expression of human k immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation”, *Proc Nat'l Acad. Sci. USA*, 81: 7161 - 7165, 1984.

Queen and Baltimore, “Immunoglobulin Gene Transcription is Activated by Downstream Sequence Elements”, *Cell*, 35: 741, 1983.

Quinn, Farina, Gardner, Krutzsch, and Levens, “Multiple components are required for sequence recognition of the ap1 site in the gibbon ape leukemia virus enhancer”, *Mol. Cell. Biol.*, 9: 4713, 1989.

Redondo, Hata, Brocklehurst, and Krangel, “A T-Cell-Specific Transcriptional Enhancer Within the Human T-Cell Receptor .delta. Locus”, *Science*, 247: 1225, 1990.

Resendez Jr., Wooden, and Lee, “Identification of highly conserved regulatory domains and protein-binding sites in the promoters of the rat and human genes encoding the stress-inducible 78-kilodalton glucose-regulated protein”, *Mol. Cell. Biol.*, 8: 4579, 1988.

Reisman and Rotter, “Induced Expression From the Moloney Murine Leukemia Virus Long Terminal Repeat During Differentiation of Human Myeloid Cells is Mediated Through its Transcriptional Enhancer”, *Mol. Cell. Biol.*, 9: 3571, 1989.

Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th Ed., pages 1035 - 1038 and 1570 - 1580.

Ripe, Lorenzen, Brenner, and Breindl, “Regulatory elements in the 5' flanking region and the first intron contribute to transcriptional control of the mouse alpha-1-type collagen gene”, *Mol. Cell. Biol.*, 9: 2224, 1989.

Rippe, Brenner and Leffert, “DNA-mediated gene transfer into adult rat hepatocytes in primary culture”, *Mol. Cell Biol.*, 10: 689 - 695, 1990.

Rittling, Coutinho, Amarm, and Kolbe, “AP-1/jun-binding Sites Mediate Serum Inducibility of the Human Vimentin Promoter”, *Nuc. Acids Res.*, 17: 1619, 1989.

Roe, Reynolds, Yu, Brown, “Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis”, *Embo. J.*, 12: 2099 - 2108, 1993.

- Rosen, Sodroski, and Haseltine**, "The location of cis-acting regulatory sequences in the human t-cell lymphotropic virus type III (HTLV-111/LAV) long terminal repeat", *Cell*, 41: 813, 1988.
- Sakai, Helms, Carlstedt-Duke, Gustafsson, Rottman, and Yamamoto**, "Hormone-Mediated Repression: A Negative Glucocorticoid-Response Element From the Bovine Prolactin Gene", *Genes and Dev.*, 2: 1144, 1988.
- Sambrook, Fritsch, Maniatis**, In: Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2 rev.ed., Cold Spring Harbor, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1(77): 19 - 17.29, 1989.
- Satake, Furukawa, and Ito**, "Biological activities of oligonucleotides spanning the f9 point mutation within the enhancer region of polyoma virus DNA", *J. Virology*, 62: 970, 1988.
- Scharfinann, Axelrod, Verma**, "Long-term *in vivo* expression of retrovirus-mediated gene transfer in mouse fibroblast implants", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 4626 - 4630, 1991.
- Schaffner, Schirm, Muller-Baden, Wever, and Schaffner**, "Redundancy of Information in Enhancers as a Principle of Mammalian Transcription Control", *J. Mol. Biol.*, 201: 81, 1988.
- Schmid, Uittenbogaart, Keld, Giorgi**, "A rapid method for measuring apoptosis and dual-color immunofluorescence by single laser flow cytometry", *J. Immunol. Methods*, 170: 145 - 157, 1994.
- Searle, Stuart, and Palmiter**, "Building a metal-responsive promoter with synthetic regulatory elements", *Mol. Cell. Biol.*, 5: 1480, 1985.
- Sharp and Marciniak**, "HIV Tar: an RNA Enhancer?", *Cell*, 59: 229, 1989.
- Shaul and Ben-Levy**, "Multiple Nuclear Proteins in Liver Cells are Bound to Hepatitis B Virus Enhancer Element and its Upstream Sequences", *EMBO J.*, 6: 1913, 1987.
- Sherman, Basta, Moore, Brown, and Ting**, "Class II Box Consensus Sequences in the HLA-DR.alpha. Gene: Transcriptional Function and Interaction with Nuclear Proteins", *Mol. Cell. Biol.*, 9: 50, 1989.
- Sleigh and Lockett**, "SV40 Enhancer Activation During Retinoic-Acid-Induced Differentiation of F9 Embryonal Carcinoma Cells", *J. EMBO*, 4: 3831, 1985.
- Spalholz, Yang, and Howley**, "Transactivation of a Bovine Papilloma Virus Transcriptional Regulatory Element by the E2 Gene Product", *Cell*, 42: 183, 1985.
- Spandau and Lee**, "Trans-Activation of Viral Enhancers by the Hepatitis B Virus X Protein", *J. Virology*, 62: 427, 1988.
- Spandidos and Wilkie**, "Host-Specificities of Papilloma Virus, Moloney Murine Sarcoma Virus and Simian Virus 40 Enhancer Sequences", *EMBO J.*, 2: 1193, 1983.
- Stephens and Hentschel**, "The Bovine Papilloma Virus Genome and its Uses as a Eukaryotic Vector", *Biochem. J.*, 248: 1, 1987.
- Stuart, Searle, and Palmiter**, "Identification of Multiple Metal Regulatory Elements in Mouse Metallothionein-I Promoter by Assaying Synthetic Sequences", *Nature*, 317: 828, 1985.
- Sullivan and Peterlin**, "Transcriptional Enhancers in the HLA-DQ Subregion", *Mol. Cell. Biol.*, 7: 3315, 1987.
- Sutton, Reitsma, Uchida, Brown**, "Transduction of human progenitor hematopoietic stem cells by human immunodeficiency virus type 1-based vectors is cell cycle dependent", *J. Virol.*, 73: 3649 - 3660, 1999.
- Sutton, Wu, Rigg, Bohnlein, Brown**, "Human immunodeficiency virus type 1 vectors efficiently transduce human hematopoietic stem cells", *J. Virol.*, 72: 5781 - 5788, 1998.
- Swartzendruber and Lehman**, "Neoplastic Differentiation: Interaction of Simian Virus 40 and Polyoma Virus with Murine Teratocarcinoma Cells", *J. Cell. Physiology*, 85: 179, 1975.
- Takebe, Seiki, Fujisawa, Hoy, Yokota, Arai, Yoshida, and Arai**, "SR.alpha. Promoter: An Efficient and Versatile Mammalian cDNA Expression System Composed of the Simian Virus 40 Early Promoter and the R-U5 Segment of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Long Terminal Repeat", *Mol. Cell. Biol.*, 8: 466, 1988.
- Taylor and Kingston**, "E1A Trans-Activation of Human HSP70 Gene Promoter Substitution Mutants is Independent of the Composition of Upstream and TATA Elements", *Mol. Cell. Biol.*, 10: 176, 1990.

Taylor and Kingston, "Factor Substitution in a Human HSP70 Gene Promoter: TATA-Dependent and TATA-Independent Interactions", *Mol. Cell. Biol.*, 10: 165, 1990.

Taylor, Solomon, Weiner, Paucha, Bradley, and Kingston, "Stimulation of the Human Heat-Shock Protein 70 Promoter *in vitro* by Simian Virus 40 Large T Antigen", *J. Biol. Chem.*, 264: 15160, 1989.

Tavernier, Gheysen, Duerinck, Can Der Heyden, and Fiers, "Deletion Mapping of the Inducible Promoter of Human IFN-beta Gene", *Nature*, 301: 634, 1983.

Thiesen, Bosze, Henry, and Charnay, "A DNA Element Responsible for the Different Tissue Specificities of Friend and Moloney Retroviral Enhancers", *J. Virology*, 62: 614, 1988.

Tronche, Rollier, Bach, Weiss, and Yaniv, "The Rat Albumin Promoter: Cooperation with Upstream Elements is Required When Binding of APF/HNF 1 to the Proximal Element is Partially Impaired by Mutation or Bacterial Methylation", *Mol. Cell. Biol.*, 9: 4759, 1989.

Tronche, Rollier, Herbomel, Bach, Cereghini, Weiss, and Yaniv, "Anatomy of the Rat Albumin Promoter", *Mol. Biol. Med.*, 7: 173, 1990.

Trudel and Constantini, "A 3' Enhancer Contributes to the Stage-Specific Expression of the human Beta-Globin Gene", *Genes and Dev.*, 6: 954, 1987.

Tsumaki y colaboradores, "Modular arrangement of cartilage- and neural tissue-specific cis-elements in the mouse alpha2(XI) collagen promoter", *J Biol Chem.* 273(36): 22861 - 22864, 1998.

Tur-Kaspa, Teicher, Levine, Skoultchi and Shafritz, "Use of electroporation to introduce biologically active foreign genes into primary rat hepatocytes", *Mol. Cell Biol.*, 6: 716 - 718, 1986.

Tyndall, La Mantia, Thacker, Favaloro, and Kamen, "A Region of the Polyoma Virus Genome Between the Replication Origin and Late Protein-Coding Sequences is Required in cis for Both Early Gene Expression and Viral DNA Replication", *Nuc. Acids. Res.*, 9: 6231, 1981.

Uchida, Sutton; Frieria, He, Reitsma, Chang, Veres, Scollay, Weissman, "HIV, but not murine leukemia virus, vectors mediate high efficiency gene transfer into freshly isolated G0/G1 human hematopoietic stem cells", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 11939 - 11944, 1998.

Ueda, Tsuji, Yoshino, Ebihara, Yagasaki, Hisakawa, Mitsui, Manabe, Tanaka, Kobayashi, Ito, Yasukawa, Nakahata, "Expansion of human NOD/SCID-repopulating cells by stem cell factor, Flk2/Flt3 ligand, thrombopoietin, IL-6, and soluble IL-6 receptor", *J. Clin. Invest.*, 105: 1013 - 1021, 2000.

Unutmaz, Kewal, Ramani, Marmon, Littman, "Cytokine signals are sufficient for HIV-1 infection of resting human T lymphocytes", *J. Exp. Med.*, 189: 1735 - 1746, 1999.

Valsamakis, Schek, Alwine, "Elements upstream of the AAUAAA within the human immunodeficiency virus polyadenylation signal are required for efficient polyadenylation *in vitro*", *Mol. Cell Biol.*, 12: 3699 - 3705, 1992.

Valsamakis, Zeichner, Carswell, Alwine, "The human immunodeficiency virus type 1 polyadenylation signal: a 3' long terminal repeat element upstream of the AAUAAA necessary for efficient polyadenylation", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 2108 - 2112, 1991.

Vannice and Levinson, "Properties of the Human Hepatitis B Virus Enhancer: Position Effects and Cell-Type Nonspecificity", *J. Virology*, 62: 1305, 1988.

Vasseur, Kress, Montreau, and Blangy, "Isolation and Characterization of Polyoma Virus Mutants Able to Develop in Multipotential Murine Embryonal Carcinoma Cells", *Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 77: 1068, 1980.

Wang and Calame, "SV40 enhancer-binding factors are required at the establishment but not the maintenance step of enhancer-dependent transcriptional activation", *Cell*, 47: 241, 1986.

Watanabe y colaboradores, "Gene transfection of mouse primordial germ cells *in vitro* and analysis of their survival and growth control", *Experimental Cell Research*, 230: 76 - 83, 1997.

Weber, De Villiers, and Schaffner, "An SV40 "Enhancer Trap" Incorporates Exogenous Enhancers or Generates Enhancers From its Own Sequences", *Cell*, 36: 983, 1984.

Weinberger, Jat, and Sharp, "Localization of a Repressive Sequence Contributing to B-cell Specificity in the Immunoglobulin Heavy-Chain Enhancer", *Mol. Cell. Biol.*, 8: 988, 1984.

Winoto and Baltimore, “ $\alpha\beta$ -lineage-specific Expression of the α T-Cell Receptor Gene by Nearby Silencers”, *Cell*, 59: 649, 1989.

Wu y colaboradores, “Promoter-dependent tissue-specific expressive nature of imprinting gene, insulin-like growth factor II, in human tissues”, *Biochem Biophys Res Commun.* 233(1): 221 - 226, 1997.

Wu, Wakefield, Liu, Xiao, Kralovics, Prchal, Kappes, “Development of a novel trans-lentiviral vector that affords predictable safety”, *Mol. Ther.* 2: 47 - 55, 2000.

Yang, Burkholder, Roberts, Martinell and McCabe, “*In vivo* and *in vitro* gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment”, *Proc Nat’l Acad Sci. USA*, 87: 9568 - 9572, 1990.

Yutzey, Kline, and Konieczny, “An Internal Regulatory Element Controls Troponin I Gene Expression”, *Mol. Cell. Biol.*, 9: 1397, 1989.

Zennou, Petit, Guetard, Nerhbass, Mantagnier, Charneau, “HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap”, *Cell* 101:173 - 185, 2000.

Zhao-Emonet y colaboradores, “The equine herpes virus 4 thymidine kinase is a better suicide gene than the human herpes virus 1 thymidine kinase”, *Gene Ther.* 6(9): 1638 - 1642, 1999.

Zufferey, Nagy, Mandel, Naldini, Trono, “Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery *in vivo*”, *Nat. Biotechnol.*, 15: 871 - 875, 1997.

Zufferey, Dull, Mandel, Bukovsky, Quiroz, Naldini, Trono, “Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient *in vivo* gene delivery”, *J. Virol.*, 72: 9873 - 9880, 1998.

Zufferey, Donello, Trono, Hope, “Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors”, *J. Virol.*, 73: 2886 - 2892, 1999.

Zufferey and Trono, Current Protocols in Neuroscience: unit 4.21: “High-titer production of lentiviral vectors”, *John Wiley & Sons, New York*, 2000.

Referencias citadas en la descripción

Este listado de referencias citado por el solicitante es únicamente para conveniencia del lector. No forma parte del documento europeo de la patente. Aunque se ha tenido gran cuidado en la recopilación, no se pueden excluir los errores o las omisiones y la OEP rechaza toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patente citados en la descripción

- US 5846233 A [0055] [0148]
- US 5846225 A [0055] [0148]
- US 5466468 A [0056] [0148]
- EP 266032 A [0073] [0148]
- US 5705629 A [0073] [0148]
- US 4683202 A [0073] [0093] [0148]
- US 4682195 A [0073] [0148]
- US 5645897 A [0073] [0148]
- US 5928906 A [0093] [0148]
- US 5686279 A [0148]
- US 5925565 A [0148]
- US 5935819 A [0148]
- US 5994136 A [0148]
- US 6013516 A [0148]
- US 6136597 A [0148]
- GB 9602061 W [0149]
- WO 9708330 A [0149]
- WO 1996 A [0149]

Literatura citada en la descripción que no es de patente

- **SALMON** y colaboradores *Journal of Gene Medicine*, 2000 [0004]
- Remington’s Pharmaceutical Sciences. 1035 - 10381570 - 1580 [0057] [0151]

- **LUO; SKALNIK.** *J. Biol. Chem.*, 1996, vol. 271, 18203 - 210 [0099]
- **LUO; SKALNIK.** *J. Biol. Chem.*, 1996, vol. 271, 23445 - 23451 [0099]
- 5 • **LIEN LL; LEE Y; ORKIN SH.** Regulation of the myeloid-cell-expressed human gp91-phox gene as studied by transfer of yeast artificial chromosome clones into embryonic stem cells: suppression of a variegated cellular pattern of expression requires a full complement of distant cis elements. *Mol Cell Biol.*, 1997, vol. 17 (4), 2279 - 90 [0100]
- 10 • **MAY C; RIVELLA S; CALLEGARI J; HELLERG; GAENSLER KM; LUZZATTO L; SADELAIN M.** Therapeutic haemoglobin synthesis in beta-thalassaemic mice expressing lentivirus-encoded human beta-globin. *Nature*, 2000, vol. 406 (6791), 82 - 6 [0101]
- 15 • **Lentiviral vectors derived from simian immunodeficiency virus (SIV. NÈGRE D; DUISIT G; MANGEOT P-E; MOULLIER P; DARLIX J-L; COSSET F-L.** *Current Topics in Microbiology and Immunology.* 2002, vol. 261, 53 - 74 [0149]
- 20 • **NALDINI L; BLÖMER U; GALLAY P; ORY D; MULLIGAN R; GAGE FH; VERMA IM; TRONO D.** *In vivo* gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*, 1996, vol. 272, 263 - 267 [0149]
- **BLÖMER U; NALDINI L; KAFRI T; TRONO D; VERMA IM; GAGE FH.** Highly efficient and sustained gene transfer in adult neurons with a lentiviral vector. *J Virol.*, 1997, vol. 71, 6641 - 6649 [0149]
- 25 • **KAFRI T; BLÖMER U; PETERSON DA; GAGE FH; VERMA IM.** Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors. *Nat Genet.*, 1997, vol. 17, 314 - 317 [0149]
- 30 • **NALDINI L; BLÖMER U; GAGE FH; TRONO D; VERMA IM.** Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 1996, vol. 93, 11382 - 11388 [0149]
- **PARK F.** Efficient lentiviral transduction of liver requires cell cycling *in vivo*. *Nat Genet.*, 2000, vol. 24, 49 - 52 [0149]
- 35 • **TAKAHASHI M; MIYOSHI H; VERMA IM; GAGE FH.** Rescue from photoreceptor degeneration in the rd mouse by human immunodeficiency virus vector-mediated gene transfer. *J Virol.*, 1999, vol. 73, 7812 - 7816 [0149]
- 40 • **CHRISTODOULOPOULOS I; CANNON P.** Sequences in the cytoplasmic tail of the gibbon ape leukemia virus envelope protein that prevent its incorporation into lentivirus vectors. *J Virol.*, 2001, vol. 75, 4129 - 4138 [0149]
- **DESMARIS N; BOSCH A; SALAUN C; PETIT C; PREVOST M. C.; TORDO N; PERRIN P; SCHWARTZ O; DEROCQUIGNY H; HEARD J. M.** Production and neurotropism of lentivirus vectors pseudotyped with lyssavirus envelope glycoproteins. *Mol Ther.*, 2001, vol. 4, 149-156 [0149]
- 45 • **KOBINGER G. P.; WEINER D. J; YU Q. C; WILSON J. M.** Filovirus-pseudotyped lentiviral vector can efficiently and stably transduce airway epithelia *in vivo*. *Nat Biotechnol.*, 2001, vol. 19, 225 - 230 [0149]
- 50 • **LEWIS B. C; CHINNASAMY N; MORGAN R. A; VARMUS H. E.** Development of an Avian Leukosis-Sarcoma Virus Subgroup A Pseudotyped Lentiviral Vector. *J Virol.*, 2001, vol. 75, 9339 - 9344 [0149]
- **MOCHIZUKI H; SCHWARTZ J. P; TANAKA K; BRADY R. O; REISER J.** High-Titer Human Immunodeficiency Virus Type 1-Based Vector Systems for Gene Delivery into Nondividing Cells. *J. Virol.*, 1998, vol. 72, 8873 - 8883 [0149]
- 55 • **SALMON P; NÈGRE D; TRONO D; COSSET F-L.** A chimeric GALV-derived envelope glycoprotein harboring the cytoplasmic tail of MLV envelope efficiently pseudotypes HIV-1 vectors. *J Gen Med.*, 2000, vol. 2, 23 [0149]
- 60 • **SANDRIN V; BOSON B; COSSET F-L.** Insertion of lentiviral protease substrates in the cytoplasmic tail of the feline endogenous virus RD114 glycoprotein enhances viral incorporation and infectivity of pseudotyped lentiviral vectors. *preparation*, 2001 [0149]
- 65 • **STITZ J; BUCHHOLZ C; ENGELSTADTER M; UCKERT W; BLOEMER U; SCHMITT I; CICHUTEK K.** Lentiviral vectors pseudotyped with envelope glycoproteins derived from gibbon ape leukemia virus and murine leukemia virus 10A1. *Virology*, 2000, vol. 273, 16 - 20 [0149]

- **GATLIN J; MELKUS M. W; PADGETT A; KELLY P. F; GARCIA J. V.** Engraftment of NOD/SCID Mice with Human CD34+ Cells Transduced by Concentrated Oncoretroviral Vector Particles Pseudotyped with the Feline Endogenous Retrovirus (RD114) Envelope Protein. *J. Virol.*, 2001, vol. 75, 9995 - 9999 [0149]
- 5 • **GOEMER M; HORN P. A; PETERSON L; KURRE P; STORB R; RASKO J. E; KIEM H. P.** Sustained multilineage gene persistence and expression in dogs transplanted with CD34(+) marrow cells transduced by RD114-pseudotype oncoretrovirus vectors. *Blood*, 2001, vol. 98, 2065 - 2070 [0149]
- 10 • **KELLY P; VANDERGRIF J; NATHWANI A; NIENHUIS A; VANIN E.** Highly efficient gene transfer into cord blood nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency repopulating cells by oncoretroviral vector particles pseudotyped with the feline endogenous retrovirus (RD114) envelope protein. *Blood*, 2000, vol. 96, 1206 - 1214 [0149]
- 15 • **MARANDIN A; DUBART A; PFLUMIO F; COSSET F-L; CORDETTE V; CHAPEL-FERNANDES S; COULOMBEL L; VAINCHENKER W; LOUACHE F.** Retroviral-mediated gene transfer into human CD34+/38- primitive cells capable of reconstituting long-term cultures *in vitro* and in nonobese diabetic-severe combined immunodeficiency mice *in vivo*. *Human Gene Ther.*, 1998, vol. 9, 1497 - 1511 [0149]
- 20 • **MOVASSAGH M; DESMYTER C; BAILLOU C; CHAPEL-FERNANDES S; GUIGON M; KLATZMANN D; LEMOINE F. M.** High-level gene transfer to cord blood progenitors using gibbon ape leukemia virus pseudotyped retroviral vectors and an improved clinically applicable protocol. *Hum Gene Ther.*, 1998, vol. 9, 225 - 234 [0149]
- 25 • **PORTER C. D; COLLINS M. K. L; TAILOR C. S; PARKER M. H; COSSET F-L; WEISS R. A; TAKEUCHI Y.** Comparison of efficiency of infection of human gene therapy target cells via four different retroviral receptors. *Human Gene Therapy*, 1996, vol. 7, 913 - 919 [0149]
- **PENG K. W; PHAM L; YE H; ZUFFEREY R; TRONO D; COSSET F-L; RUSSELL S. J.** Organ distribution of gene expression after intravenous infusion of targeted and untargeted lentiviral vectors. *Gene Therapy*, 2001, vol. 8, 1456 - 1463 [0149]
- 30 • **SEGANTI L; SUPERTI F; GIRMENIA C; MELUCCI L; ORSI N.** Study of receptors for vesicular stomatitis virus in vertebrate and invertebrate cells. *Microbiologica*, 1986, vol. 9, 259 - 267 [0149]
- 35 • **DEPOLO N. J; REED J. D; SHERIDAN P. L; TOWNSEND K; SAUTER S. L; JOLLY D. J; DUBENSKY T. W.** VSV-G pseudotyped lentiviral vector particles produced in human cells are inactivated by human serum. *Mol Ther.*, 2000, vol. 2, 218 - 222 [0149]
- 40 • **NÈGRE D; MANGEOT P; DUISIT G; BLANCHARD S; VIDALAIN P; LEISSNER P; WINTER A; RA-BOURDIN-COMBE C; MEHTALI M; MOULLIER P.** Characterization of novel safe lentiviral vectors derived from simian immunodeficiency virus (SIVmac251) that efficiently transduce mature human dendritic cells. *Gene Ther.*, 2000, vol. 7, 1613 - 1623 [0149]
- 45 • **SALMON P; KINDLER V; DUCREY O; CHAPUIS B; ZUBLER RH; TRONO D.** High-level transgene expression in human hematopoietic progenitors and differentiated blood lineages after transduction with improved lentiviral vectors. *Blood*, 2000, vol. 96, 3392 - 3398 [0149]
- **SALMON P; ARRIGHI JF; PIGUET V; CHAPUIS B; ZUBLER RH; TRONO D; KINDLER V.** Transduction of CD34+ cells with lentiviral vectors enables the production of large quantities of transgene-expressing immature and mature dendritic cells. *J Gene Med.*, 2001, vol. 3, 311 - 320 [0149]
- 50 • **THIEBOT H; LOUACHE F; VASLIN B; REVEL T. D; NEILDEZO; LARGHERO J; VAINCHENKER W; DORMONT D; GRANDRL.** Early and persistent bone marrow hematopoiesis defect in simian/human immunodeficiency virus-infected macaques despite efficient reduction of viremia by highly active antiretroviral therapy during primary infection. *J Virol.*, 2001, vol. 75, 11594 - 11602 [0149]
- 55 • **MAURICEM; VERHOEYENE; SALMONP; TRONO D; RUSSELL S. J; COSSET F-L.** Efficient gene transfer into human primary blood lymphocytes by surface-engineered lentiviral vectors that display a T cell-activating polypeptide. *Blood*, 2002, 99 [0149]
- 60 • **MANGEOT P-E; NÈGRE D; DUBOIS B; WINTER A. J; LEISSNER P; METHALI M; KAISERLIAN D; COSSET F-L; DARLIX J-L.** Development of minimal lentiviral vectors derived from simian immunodeficiency virus (SIVmac251) and their use for the gene transfer in human dendritic cells. *J Virol.*, 2000, vol. 74, 8307 - 8315 [0149]
- 65 • **YEE J. K; FRIEDMANN T; BUMS J. C.** Generation of high-titer pseudotyped retroviral vectors with very broad host range. *Methods Cell Biol.*, 1994, vol. 43, 99 - 112 [0149]

- **HATZIOANNOU T; VALSESIA-WITTMANN S; RUSSELL S; COSSET F-L.** Incorporation of fowl plague virus hemagglutinin into murine leukemia virus particles and analysis of the infectivity of the pseudotyped retroviruses. *J Virol.*, 1998, vol. 72, 5313 - 5317 [0149]
- 5 • **COSSET F-L; TAKEUCHI Y; BATTINI J; WEISS R; COLLINS M.** High titer packaging cells producing recombinant retroviruses resistant to human serum. *J. Virol.*, 1995, vol. 69, 7430 - 7436 [0149]
- **OTTD; FRIEDRICH R; REIN A.** Sequence analysis of amphotropic and 10A1 murine leukemia virus: close relationship to mink cell focus forming viruses. *J Virol.*, 1990, vol. 64, 757 - 766 [0149]
- 10 • **TAKEUCHI Y; COSSET F. L; LACHMANN P. J; OKADA H; WEISS R. A; COLLINS MKL.** Type C retrovirus inactivation by human complement is determined by both the viral genome and producer cell. *J. Virol.*, 1994, vol. 68, 8001 - 8007 [0149]
- 15 • **MATHEUX F; LAURET E; ROUSSEAU V; LARGHERO J; BOSON B; VASLIN B; CHERET A; DE-MAEYER E; DORMONT D; LEGRAND R.** Simian immunodeficiency virus resistance of macaques infused with interferon beta-engineered lymphocytes. *J Gen Virol.*, 2000, vol. 81, 2741 - 2750 [0149]
- 20 • **HATZIOANNOU T; DELAHAYE E; MARTIN F; RUSSELL S. J; COSSET F-L.** Retroviral display of functional binding domains fused to the amino-terminus of influenza haemagglutinin. *Human Gene Therapy*, 1999, vol. 10, 1533 - 1544 [0149]
- **FREED E. O.** HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. *Virology*, 1998, vol. 251, 1 - 15 [0149]
- 25 • **BOSCH V; KRAMER B; PFEIFFER T; STARCK L; STEINHAEUER D. A.** Inhibition of release of lentivirus particles with incorporated human influenza virus haemagglutinin by binding to sialic acid-containing cellular receptors. *J Gen Virol.*, 2001, vol. 82, 2485 - 2494 [0149]
- **WAGNER R; WOLFF T; HERWIG A; PLESCHKA S; KLENK HD.** Interdependence of hemagglutinin glycosylation and neuraminidase as regulators of influenza virus growth: a study by reverse genetics. *J Virol.*, 2000, vol. 74, 6316 - 6323 [0149]
- 30 • **CARSTANJEN D; DUTT P; MORITZ T.** Heparin inhibits retrovirus binding to fibronectin as well as retrovirus gene transfer on fibronectin fragments. *J Virol.*, 2001, vol. 75, 6218 - 6222 [0149]
- 35 • **MORITZ T; DUTT P; XIAO X; CARSTANJEN D; VIK T; HANENBERG H; WILLIAMS D. A.** Fibronectin improves transduction of reconstituting hematopoietic stem cells by retroviral vectors: evidence of direct viral binding to chymotryptic carboxy-terminal fragments. *Blood*, 1996, vol. 88, 855 - 862 [0149]
- 40 • **RELANDER T; BRUN A; HAWLEY RG; KARLSSON S; RICHTER J.** Retroviral transduction of human CD34+ cells on fibronectin fragment CH-296 is inhibited by high concentrations of vector containing medium. *J Gene Med.*, 2001, vol. 3, 207 - 218 [0149]
- **HAAS D. L; CASE S. S; CROOKS G. M; KOHN D. B.** Critical factors influencing stable transduction of human CD34(+) cells with HIV-1-derived lentiviral vectors. *Mol Ther.*, 2000, vol. 2, 71 - 80 [0149]
- 45 • **DARDALHON V; HERPERS B; NORAZ N; PFLUMIO F; GUETARD D; LEVEAUC; DUBART-KUPPERSCHMITT A; CHARNEAU P; TAYLOR N.** Lentivirus-mediated gene transfer in primary T cells is enhanced by a central DNA flap. *Gene therapy*, 2001, vol. 8, 190 - 198 [0149]
- 50 • **SLINGSBY J. H; BABAN D; SUTTON J; ESAPA M; PRICE T; KINGSMAN S. M; KINGSMAN A. J; SLADE A.** Analysis of 4070A envelope levels in retroviral preparations and effect on target cell transduction efficiency. *Hum Gene Ther.*, 2000, vol. 11, 1439 - 1451 [0149]
- 55 • **OTT D. E.** Cellular proteins in HIV virions. *Rev Med Virol.*, 1997, vol. 7, 167 - 180 [0149]
- **Synthesis, assembly, and processing of viral proteins. SWANSTROM R; WILLS J. W.** Retroviruses. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1997, 263 - 334 [0149]
- 60 • **TAKEUCHI Y; SIMPSON G; VILE R; WEISS R; COLLINS M.** Retroviral pseudotypes produced by rescue of moloney murine leukemia virus vector by C-type, but not D-type, retroviruses. *Virology*, 1992, vol. 186, 792 - 794 [0149]
- **PICKL W. F; PIMENTEL-MUINOS F. X; SEED B.** Lipid rafts and pseudotyping. *J Virol.*, 2001, vol. 75, 7175-7183 [0149]
- 65 • **COSSON P.** Direct interaction between the envelope and matrix proteins of HIV-1. *The Embo J.*, 1996, vol. 15, 5783 - 5788 [0149]

- **MURAKAMI T; FREED E. O.** Genetic evidence for an interaction between human immunodeficiency virus type 1 matrix and alpha-helix 2 of the gp41 cytoplasmic tail. *J Virol.*, 2000, vol. 74, 3548 - 3554 [0149]
- **VINCENT M. J; MELSEN L. R; MARTIN A. S; COMPANS R. W.** Intracellular interaction of simian immunodeficiency virus Gag and Env proteins. *J Virol.*, 1999, vol. 73, 8138 - 8144 [0149]
- **WYMA D. J; KOTOV A; AIKEN C.** Evidence for a stable interaction of gp41 with Pr55(Gag) in immature human immunodeficiency virus type 1 particles. *J Virol.*, 2000, vol. 74, 9381 - 9387 [0149]
- **BRODYBA; RHEE S. S; HUNTER E.** Postassembly cleavage of a retroviral glycoprotein cytoplasmic domain removes a necessary incorporation signal and activates fusion activity. *J Virol.*, 1994, vol. 68, 4620 - 4627 [0149]
- **RAGHEB J. A; ANDERSON W. F.** pH-independent murine leukemia virus ecotropic envelope-mediated cell fusion: Implications for the role of the R peptide and p12E TM in viral entry. *J Virol.*, 1994, vol. 68, 3220 - 3231 [0149]
- **REIN A; MIRRO J; HAYNES J. G; ERNST S. M; NAGASHIMA K.** Function of the cytoplasmic domain of a retroviral transmembrane protein: p15E-p2E cleavage activates the membrane fusion capability of the murine leukemia virus env protein. *J Virol.*, 1994, vol. 68, 1773 - 1781 [0149]
- **GALILI U; SHOHET S. B; KOBRIN E; STULTS C. L; MACHER B. A.** Man, apes, and Old World monkeys differ from other mammals in the expression of alpha-galactosyl epitopes on nucleated cells. *J Biol Chem.*, 1988, vol. 263, 17755 - 17762 [0149]
- **ROTHER R. P; FODOR W. L; SPRINGHORN J. P; BIRKSCW; SETTERE; SANDRINMS; SQUINTO S. P; ROLLINS S. A.** A novel mechanism of retrovirus inactivation in human serum mediated by anti-alpha-galactosyl natural antibody. *J Exp Med.*, 1995, vol. 182, 1345 - 1355 [0149]
- **TAKEUCHI Y; PORTER C; STRAHAN K; PREECE A; GUSTAFSSON K; COSSET F-L; WEISS R; COLLINS M.** Sensitisation of cells and retroviruses to human serum by alpha(1-3) galactosyltransferase. *Nature*, 1996, vol. 379, 85 - 88 [0149]
- **TAKEUCHI Y; LIONGSH; BIENIASZPD; JAGER U; PORTER C. D; FRIEDMAN T; MCCLURE M. O; WEISS R. A.** Sensitization of rhabdo-, lenti-, and spumaviruses to human serum by galactosyl(alpha1-3)galactosylation. *J Virol.*, 1997, vol. 71, 6174 - 6178 [0149]
- **DEPOLO N. J; HARKLEROAD C. E; BODNER M; WATT A. T; ANDERSON C. G; GREENGARD J. S; MURTHYKK; JRTWD; JOLLY D. J.** The resistance of retroviral vectors produced from human cells to serum inactivation *in vivo* and *in vitro* is primate species dependent. *J Virol.*, 1999, vol. 73, 6708 - 6714 [0149]
- **MONTEFIORI D. C; CORNELL R. J; ZHOU J. Y; ZHOU J. T; HIRSCH V. M; JOHNSON P. R.** Complement control proteins, CD46, CD55, and CD59, as common surface constituents of human and simian immunodeficiency viruses and possible targets for vaccine protection. *Virology*, 1994, vol. 205, 82 - 92 [0149]
- **LAVILLETTE D; RUSSELL S. J; COSSET F-L.** Retargeting gene delivery by surface-engineered retroviral vector particles. *Current Opinion in Biotechnology*, 2001, vol. 12, 461 - 466 [0149]
- **RUSSELL S. J; COSSET F-L.** Modifying the Host Range Properties of Retroviral Vectors. *Journal of Gene Medicine*, 1999, vol. 1, 300 - 311 [0149]
- **DONAHUE R. E; SORRENTINO B. P; HAWLEY R. G; AN D. S; CHEN I. S; WERSTO R. P.** Fibronectin fragment CH-296 inhibits apoptosis and enhances *ex vivo* gene transfer by murine retrovirus and human lentivirus vectors independent of viral tropism in nonhuman primate CD34+ cells. *Mol Ther.*, 2001, vol. 3, 359 - 367 [0149]
- **PIZZATO M; MARLOW S. A; BLAIR E. D; TAKEUCHI Y.** Initial binding of murine leukemia virus particles to cells does not require specific Env-receptor interaction. *J Virol.*, 1999, vol. 73, 8599 - 8611 [0149]
- **BARNETT A. L; CUNNINGHAM J. M.** Receptor binding transforms the surface subunit of the mammalian C-type retrovirus envelope protein from an inhibitor to an activator of fusion. *J Virol.*, 2001, vol. 75, 9096 - 9105 [0149]
- **JINNO-OUE A; OUE M; RUSCETTI SK.** A unique heparin-binding domain in the envelope protein of the neuropathogenic PVC-211 murine leukemia virus may contribute to its brain capillary endothelial cell tropism. *J Virol.*, 2001, vol. 75, 12439 - 12445 [0149]
- **KLIMSTRA W. B; HEIDNER H. W; JOHNSTON R. E.** The furin protease cleavage recognition sequence of Sindbis virus PE2 can mediate virion attachment to cell surface heparan sulfate. *J Virol.*, 1999, vol. 73, 6299 - 6306 [0149]

- **UCKERT W; WILLIMSKY G; PEDERSEN F. S; BLANKENSTEIN T; PEDERSEN L.** RNA levels of human retrovirus receptors Pit1 and Pit2 do not correlate with infectibility by three retroviral vector pseudotypes. *Hum Gene Ther.*, 1998, vol. 9, 2619 - 2627 [0149]
- 5 • **LAVILLETTE D; BOSON B; RUSSELL S; COSSET F-L.** Membrane fusion by murine leukemia viruses is activated in cis or in trans by interactions of the receptor-binding domain with a conserved disulfide loop at the carboxy-terminus of the surface glycoproteins. *J of Virol.*, 2001, vol. 75, 3685 - 3695 [0149]
- 10 • **RODRIGUES P; HEARD J. M.** Modulation of Phosphate Uptake and Amphotropic Murine Leukemia Virus Entry by Posttranslational Modifications of PIT-2. *J. Virol.*, 1999, 3789 - 3799 [0149]
- 15 • **BERLIOZ-TORRENT, C.; B. L. SHACKLETT; L. ERDTMANN; L. DELAMARRE; I. BOUCHAERT; P. SONIGO; M. C. DOKHELAR; R. BENAROUS.** Interactions of the cytoplasmic domains of human and simian retroviral transmembrane proteins with components of the clathrin adaptor complexes modulate intracellular and cell surface expression of envelope glycoproteins. *J Virol.*, 1999, vol. 73, 1350 - 1361 [0150]
- 20 • **BRODY, B. A.; S. S. RHEE; E. HUNTER.** Postassembly cleavage of a retroviral glycoprotein cytoplasmic domain removes a necessary incorporation signal and activates fusion activity. *J Virol.*, 1992, vol. 68, 4620 - 4627 [0150]
- 25 • **BRODY, B. A.; S. S. RHEE; M.A. SOMMERFELT; E. HUNTER.** A viral protease-mediated cleavage of the transmembrane glycoprotein of Mason-Pfizer monkey virus can be suppressed by mutations within the matrix protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1992, vol. 89, 3443 - 7 [0150]
- 30 • **CHRISTODOULOPOULOS, I.; P. CANNON.** Sequences in the cytoplasmic tail of the gibbon ape leukemia virus envelope protein that prevent its incorporation into lentivirus vectors. *J Virol.*, 2001, vol. 75, 4129 - 38 [0150]
- 35 • **COLLAWN, J. F.; A. LAI; D. DOMINGO; M. FITCH; S. HATTON; I. S. TROWBRIDGE.** YTRF is the conserved internalization signal of the transferrin receptor, and a second YTRF signal at position 31-34 enhances endocytosis. *J Biol Chem.*, 1993, vol. 268, 21686 - 21692 [0150]
- 40 • **COSSET, F.-L.; Y. TAKEUCHI; J. BATTINI; R. WEISS; M. COLLINS.** High titer packaging cells producing recombinant retroviruses resistant to human serum. *J. Virol.*, 1995, vol. 69, 7430 - 7436 [0150]
- 45 • **COSSON, P.** Direct interaction between the envelope and matrix proteins of HIV-1. *The Embo J.*, 1996, vol. 15, 5783 - 5788 [0150]
- 50 • **DELAMARRE, L.; C. PIQUE; A. R. ROSENBERG; V. BLOT; M. P. GRANGE; I. L. BLANC; M. C. DOKHELAR.** The Y-S-L-I tyrosine-based motif in the cytoplasmic domain of the human T-cell leukemia virus type 1 envelope is essential for cell-to-cell transmission. *J Virol.*, 1996, vol. 73, 9659 - 9663 [0150]
- 55 • **DENESVRE, C.; C. CARRINGTON; A. CORBIN; Y. TAKEUCHI; F.-L. COSSET; T. SCHULZ; M. SIT-BON; P. SONIGO.** TM domain swapping of murine leukemia virus and human T-cell leukemia virus envelopes confers different infectious abilities despite similar incorporation into virions. *J. Virol.*, 1996, vol. 70, 4380 - 4386 [0150]
- 60 • **FIELDING, A.; S. CHAPEL-FERNANDES; M. CHADWICK; F. BULLOUGH; F.-L. COSSET; S. RUSSELL.** A hyperfusogenic Gibbon ape leukemia virus envelope glycoprotein: targeting of a cytotoxic gene by ligand display. *Human Gene Therapy*, 2000, vol. 11, 817 - 826 [0150]
- 65 • **FREED, E. O.** HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. *Virology*, 1998, vol. 251, 1 - 15 [0150]
- 70 • **FREED, E. O.; M. A. MARTIN.** Virion incorporation of envelope glycoproteins with long but not short cytoplasmic tails is blocked by specific, single amino acid substitutions in the human immunodeficiency virus type 1 matrix. *J Virol.*, 1995, vol. 69, 1984 - 1989 [0150]
- 75 • **GRANGE, M.; V. BLOT; L. DELAMARRE; I. BOUCHAERT; A. ROCCA; A. DAUTRYVARSA; M. DOKHELAR.** Identification of two intracellular mechanisms leading to reduced expression of oncoretrovirus envelope glycoproteins at the cell surface. *J Virol.*, 2000, vol. 74, 11734 - 11743 [0150]
- 80 • **JANUSZESKI, M. M.; P. M. CANNON; D. CHEN; Y. ROZENBERG; W. F. ANDERSON.** Functional analysis of the cytoplasmic tail of Moloney murine leukemia virus envelope protein. *J Virol.*, 1997, vol. 71, 3613 - 9 [0150]
- 85 • **KIERNAN, R. E.; E. O. F. EO.** Cleavage of the murine leukemia virus transmembrane env protein by human immunodeficiency virus type 1 protease: transdominant inhibition by matrix mutations. *J Virol.*, 1998, vol. 72, 9621 - 7 [0150]

- **KIM, F. J.; I. SEILIEZ; C. DENESVRE; D. LAVILLETTE; F.-L. COSSET; M. SITBON.** Definition of an amino-terminal domain of the human T-cell leukemia virus type 1 envelope surface unit which extends the fusogenic range of an ecotropic murine leukemia virus. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, vol. 275, 23417 - 20 [0150]
- **LI, M.; C. YANG; R. W. COMPANS.** Mutations in the cytoplasmic tail of murine leukemia virus envelope protein suppress fusion inhibition by R peptide. *J Virol.*, 2001, vol. 75, 2337 - 44 [0150]
- **LINDWASSER, O. W; M. D. RESH.** Multimerization of human immunodeficiency virus type 1 Gag promotes its localization to barges, raft-like membrane microdomains. *J Virol.*, 2001, vol. 75, 7913 - 24 [0150]
- **LODGE, R.; L. DELAMARRE; J. P. LALONDE; J. ALVARADO; D. A. SANDERS; M. C. DOKHELAR; E. A. COHEN; G. LEMAY.** Two distinct oncornaviruses harbor an intracytoplasmic tyrosine-based basolateral targeting signal in their viral envelope glycoprotein. *J Virol.*, 1997, vol. 71, 5696 - 702 [0150]
- **MANGEOT, P.-E.; D. NÈGRE; B. DUBOIS; A. J. WINTER; P. LEISSNER; M. METHALI; D. KAISERLIAN; F.-L. COSSET; J.-L. DARLIX.** Development of minimal lentiviral vectors derived from simian immunodeficiency virus (SIVmac251) and their use for the gene transfer in human dendritic cells. *J Virol.*, 2000, vol. 74, 8307 - 8315 [0150]
- **MURAKAMI, T.; E. O. FREED.** Genetic evidence for an interaction between human immunodeficiency virus type 1 matrix and alpha-helix 2 of the gp41 cytoplasmic tail. *J Virol.*, 2000, vol. 74, 3548 - 54 [0150]
- **NALDINI, L.; U. BLÖMER; P. GALLAY; D. ORY; R. MULLIGAN; F. H. GAGE, I; M. VERMA; D. TRONO.** *In vivo* gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*, 1996, vol. 272, 263 - 267 [0150]
- Lentiviral vectors derived from simian immunodeficiency virus (SIV. **NÈGRE, D.; G. DUISIT; P.-E. MANGEOT; P. MOULLIER; J.-L. DARLIX; F.-L. COSSET.** Current Topics in Microbiology and Immunology. 2002, vol. 261, 53 - 74 [0150]
- **NÈGRE, D.; P. MANGEOT; G. DUISIT; S. BLANCHARD; P. VIDALAIN; P. LEISSNER; A. WINTER; C. RABOURDIN-COMBE; M. MEHTALI; P. MOULLIER.** Characterization of novel safe lentiviral vectors derived from simian immunodeficiency virus (SIVmac251) that efficiently transduce mature human dendritic cells. *Gene Ther.*, 2000, vol. 7, 1613 - 1623 [0150]
- **NGUYEN, D. H.; J. E. HILDRETH.** Evidence for budding of human immunodeficiency virus type 1 selectively from glycolipid-enriched membrane lipid rafts. *J Virol.*, 2000, vol. 74, 3264 - 72 [0150]
- **ONO, A.; E. O. FREED.** Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release. *PNAS*, 2001, vol. 98, 13925 - 13930 [0150]
- **OTT, D.; R. FRIEDRICH; A. REIN.** Sequence analysis of amphotropic and 10A1 murine leukemia virus: close relationship to mink cell focus forming viruses. *J Virol.*, 2001, vol. 64, 757 - 766 [0150]
- **OVERBAUGH, J.; A. D. MILLER; M. V. EIDEN.** Receptors and Entry Cofactors for Retroviruses Include Single and Multiple Transmembrane-Spanning Proteins as well as Newly Described Glycophosphatidylinositol-Anchored and Secreted Proteins Microbiol. *Mol Biol Rev.*, 2001, vol. 65, 371 - 89 [0150]
- **PICKL, W. F.; F. X. PIMENTEL-MUINOS; B. SEED.** Lipid rafts and pseudotyping. *J Virol.*, 2001, vol. 75, 7175 - 83 [0150]
- **RAGHEB, J. A.; W. F. ANDERSON.** pH-independent murine leukemia virus ecotropic envelope-mediated cell fusion: Implications for the role of the R peptide and p12E TM in viral entry. *J Virol.*, 1994, vol. 68, 3220 - 3231 [0150]
- **RASKO, J. E.; J. L. BATTINI; R. J. GOTTSCHALK; I. MAZO; A. D. MILLER.** The RD114/simian type D retrovirus receptor is a neutral amino acid transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1999, vol. 96, 2129 - 2134 [0150]
- **REEVES, R. H.; S. J. O'BRIEN.** Molecular genetic characterisation of the RD114 gene family of endogenous feline retroviral sequences. *J. Virol.*, 1984, vol. 52, 164 - 171 [0150]
- **REIN, A.; J. MIRRO; J. G. HAYNES; S. M. ERNST; K. NAGASHIMA.** Function of the cytoplasmic domain of a retroviral transmembrane protein: p15E-p2E cleavage activates the membrane fusion capability of the murine leukemia virus env protein. *J Virol.*, 1994, vol. 68, 1773 - 1781 [0150]

- **SALMON, P.; D. NÈGRE; D. TRONO; F.-L. COSSET.** A chimeric GALV-derived envelope glycoprotein harboring the cytoplasmic tail of MLV envelope efficiently pseudotypes HIV-1 vectors. *J Gen Med.*, 2000, vol. 2, 23 [0150]
- 5 • **SANDRIN, V.; B. BOSON; P. SALMON; W. GAY; D. NÈGRE; R. L. GRAND; D. TRONO; F.-L. COSSET.** Lentiviral vectors pseudotyped with a modified RD114 envelope glycoprotein show increased stability in sera and augmented transduction of primary lymphocytes and CD34+ cells derived from human and non-human primates. *Blood*, 2002 [0150]
- 10 • **STITZ, J.; C. BUCHHOLZ; M. ENGELSTADTER; W. UCKERT; U. BLOEMER; I. SCHMITT; K. CI-CHUTEK.** Lentiviral vectors pseudotyped with envelope glycoproteins derived from gibbon ape leukemia virus and murine leukemia virus 10A1. *Virology*, 2000, vol. 273, 16 - 20 [0150]
- 15 • **Synthesis, assembly, and processing of viral proteins. SWANSTROM, R.; J. W. WILLS.** Retroviruses. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1997, 263 - 334 [0150]
- 20 • **TAILOR, C. S.; A. NOURI; Y. ZHAO; Y. TAKEUCHI; D. KABAT.** A sodium-dependent neutral-amino-acid transporter mediates infections of feline and baboon endogenous retroviruses and simian type Dretroviruses. *J Virol.*, 1999, vol. 73, 4470 - 4474 [0150]
- 25 • **TAKEUCHI, Y.; F. L. COSSET; P. J. LACHMANN; H. OKADA; R. A. WEISS; M. K. L. COLLINS.** Type Cretrovirus inactivation by human complement is determined by both the viral genome and producer cell. *J. Virol.*, 1994, vol. 68, 8001 - 8007 [0150]
- 30 • **TAKEUCHI, Y.; R. G. VILE; G. SIMPSON; B. O'HARA; M. K. L. COLLINS; R. A. WEISS.** Feline leukemia virus subgroupBuses thesamcell surface receptor as gibbon ape leukemia virus. *J Virol.*, 1992, vol. 66, 1219 - 1222 [0150]
- 35 • **VINCENT, M. J.; L. R. MELSEN; A. S. MARTIN; R. W. COMPANS.** Intracellular interaction of simian immunodeficiency virus Gag and Env proteins. *J Virol.*, 1999, vol. 73, 8138 - 44 [0150]
- 40 • **WYMA, D. J.; A. KOTOV; C. AIKEN.** Evidence for a stable interaction of gp41 with Pr55(Gag) in immature human immunodeficiency virus type 1 particles. *J Virol.*, 2000, vol. 74, 9381 - 7 [0150]
- 45 • **YANG, C.; R. W. COMPANS.** Analysis of the murine leukemia virusRpeptide: delineation of the molecular determinants which are important for its fusion inhibition activity. *J Virol.*, 1997, vol. 71, 8490 - 8496 [0150]
- 50 • **YEE, J. K.; T. FRIEDMANN; J. C. BURNS.** Generation of high-titer pseudotyped retroviral vectors with very broad host range. *Methods Cell Biol.*, 1994, vol. 43, 99 - 112 [0150]
- 55 • **AKKINA; WALTON; CHEN; LI; PLANELLES; CHEN.** High-efficiency gene transfer into CD34+ cells with a human immunodeficiency virus type 1-based retroviral vector pseudotyped with vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein G. *J. Virol.*, 1996, vol. 70, 2581 - 2585 [0151]
- 60 • **ALMENDRO y colaboradores** Cloning of the human platelet endothelial cell adhesion molecule-1 promoter and its tissue-specific expression. Structural and functional characterization. *J. Immunol.*, 1996, vol. 157 (12), 5411 - 5421 [0151]
- 65 • **AN; WERSTO; AGRICOLA; METZGER; LU; AMADO; CHEN; DONAHUE.** Marking and gene expression by a lentivirus vector in transplanted human and nonhuman primate CD34(+) cells. *J. Virol.*, 2000, vol. 74, 1286 - 1295 [0151]
- 70 • **ANGEL; BAUMAN; STEIN; DELLUS; RAHMSDORF; HERRLICH.** 12-0-tetradecanoyl-phorbol-13-ace-tate Induction of the Human Collagenase Gene is Mediated by an Inducible Enhancer Element Located in the 5' Flanking Region. *Mol. Cell. Biol.*, 1987, vol. 7, 2256 [0151]
- 75 • **ANGEL; IMAGAWA; CHIU; STEIN; IMBRA; RAHMSDORF; JONAT; HERRLICH; KARIN.** Phorbol Ester-Inducible Genes Contain a Common cis Element Recognized by a TPA-Modulated Trans-acting Factor. *Cell*, 1987, vol. 49, 729 [0151]
- 80 • **ARRIGHI; HAUSER; CHAPUIS; ZUBLER; KINDLER.** Long-term culture of human CD34(+) progenitors with FLT3-ligand, thrombopoietin, and stem cell factor induces extensive amplification of a CD34(-)CD14(-) and CD34(-)CD14(+) dendritic cell precursor. *Blood*, 1999, vol. 93, 2244 - 2252 [0151]
- 85 • **ATCHISON; PERRY.** Tandem Kappa Immunoglobulin Promoters are Equally Active in the Presence of the Kappa Enhancer: Implications for Model of Enhancer Function. *Cell*, 1986, vol. 46, 253 [0151]

- **ATCHISON; PERRY.** The Role of the Kappa Enhancer and its Binding Factor NF-kappa B in the Developmental Regulation of Kappa Gene Transcription. *Cell*, 1987, vol. 48, 121 [0151]
- **BANERJI y colaboradores** Expression of a Beta-Globin Gene is Enhanced by Remote SV40DNA Sequences. *Cell*, 1981, vol. 27, 299 [0151]
- **BANERJI; OLSON; SCHAFFNER.** A lymphocyte-specific cellular enhancer is located downstream of the joining region in immunoglobulin heavy-chain genes. *Cell*, 1983, vol. 35, 729 [0151]
- **BERKHOUT; SILVERMAN; JEANG.** Tat Trans-activates the Human Immunodeficiency Virus Through a Nascent RNA Target. *Cell*, 1989, vol. 59, 273 [0151]
- **BHATIA; BONNET; KAPP; WANG; MURDOCH; DICK.** Quantitative analysis reveals expansion of human hematopoietic repopulating cells after short-term *ex vivo* culture. *J. Exp. Med.*, 1997, vol. 186, 619 - 624 [0151]
- **BLANAR; BALDWIN; FLAVELL; SHARP.** Agamma-interferon-induced factor that binds the interferon response sequence of the MHC class I gene, H-2Kb. *EMBO J.*, 1989, vol. 8, 1139 [0151]
- **BLOMER; NALDINI; KAFRI; TRONO; VERMA, GAGE.** Highly efficient and sustained gene transfer in adult neurons with a lentivirus vector. *J. Virol.*, 1997, vol. 71, 6641 - 6649 [0151]
- **BODINE; LEY.** An enhancer element lies 3' to the human alpha gamma globin gene. *EMBO J.*, 1987, vol. 6, 2997 [0151]
- **BOSHART; WEBER; JAHN; DORSCHHASLER; FLECKENSTEIN; SCHAFFNER.** A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell*, vol. 41, 521 [0151]
- **BOSZE; THIESEN; CHARNAY.** A transcriptional enhancer with specificity for erythroid cells is located in the long terminal repeat of the friend murine leukemia virus. *EMBO J.*, 1986, vol. 5, 1615 [0151]
- **BRADDOCK; CHAMBERS; WILSON; ESNOUF; ADAMS; KINGSMAN; KINGSMAN.** HIV-I Tat activates presynthesized RNA in the nucleus. *Cell*, 1989, vol. 58, 269 [0151]
- **BRAY; PRASAD; DUBAY; HUNTER; JEANG; REKOSH; HAMMARSKJOLD.** A small element from the Mason-Pfizer monkey virus genome makes human immunodeficiency virus type 1 expression and replication Rev-independent. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1994, vol. 91, 1256 - 60 [0151]
- **BROWN; TILEY; CULLEN.** Efficient polyadenylation within the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat requires flanking U3-specific sequences. *J. Virol.*, 1991, vol. 65, 3340 - 3343 [0151]
- **BULLA; SIDDIQUI.** The hepatitis B virus enhancer modulates transcription of the hepatitis B virus surface-antigen gene from an internal location. *J. Virol.*, 1986, vol. 62, 1437 [0151]
- **CAMPBELL; VILLARREAL.** Functional analysis of the individual enhancer core sequences of poliovirus: cell-specific uncoupling of DNA replication from transcription. *Mol. Cell. Biol.*, 1988, vol. 8, 1993 [0151]
- **CAMPERE; TILGHMAN.** Postnatal repression of the alpha-fetoprotein gene is enhancer independent. *Genes and Dev*, 1989, vol. 3, 537 [0151]
- **CAMPO; SPANDIDOS; LANG; WILKIE.** Transcriptional control signals in the genome of bovine papilloma virus type I. *Nature*, 1983, vol. 303, 77 [0151]
- **CARBONELLI y colaboradores** A plasmid vector for isolation of strong promoters in *E. coli*. *FEMS Microbiol Lett.*, 1999, vol. 177 (1), 75 - 82 [0151]
- **CASE; PRICE; JORDAN; YU; WANG; BAUER; HAAS; XU; STRIPECKE; NALDINI.** Stable transduction of quiescent CD34(+)CD38(-) human hematopoietic cells by HIV-1 based lentiviral vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, vol. 96, 2988 - 2993 [0151]
- **CELANDER; HASELTINE.** Glucocorticoid Regulation of Murine Leukemia Virus Transcription Elements is Specified by Determinants Within the Viral Enhancer Region. *J. Virology*, 1987, vol. 61, 269 [0151]
- **CELANDER; HSU; HASELTINE.** Regulatory Elements Within the Murine Leukemia Virus Enhancer Regions Mediate Glucocorticoid Responsiveness. *J. Virology*, 1988, vol. 62, 1314 [0151]
- **CHANDLER; MALER; YAMAMOTO.** DNA Sequences Bound Specifically by Glucocorticoid Receptor *in vitro* Render a Heterologous Promoter Hormone Responsive *in vivo*. *Cell*, 1983, vol. 33, 489 [0151]

• **CHANDLER** y colaboradores RNA splicing specificity determined by the coordinated action of RNA recognition motifs in SR proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1997, vol. 94 (8), 3596 - 3601 [0151]

• **CHANG; ERWIN; LEE.** Glucose-regulated Protein (GRP94 and GRP78) Genes Share Common Regulatory Domains and are Coordinately Regulated by Common Trans-acting Factors. *Mol. Cell. Biol.*, 1989, vol. 9, 2153 [0151]

• **CHARNEAU; MIRAMBEAU; ROUX; PAULOUS; BUC; CLAVEL.** HIV-1 reverse transcription: a termination step at the center of the genome. *J. Mol. Biol.*, 1994, vol. 241, 651 - 662 [0151]

• **CHATTERJEE; LEE; RENTOUMIS; JAMESON.** Negative Regulation of the Thyroid-Stimulating Hormone Alpha Gene by Thyroid Hormone: Receptor Interaction Adjacent to the TATA Box. *Proc Natl. Acad Sci. U.S.A.*, 1989, vol. 86, 9114 [0151]

• **CHEN; OKAYAMA.** High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol. Cell. Biol.*, 1987, vol. 7, 2745 - 2752 [0151]

• **CHERRINGTON; GANEM.** Regulation of polyadenylation inhumanimmunodeficiency virus (HIV): contributions of promoter proximity and upstream sequences. *Embo. J.*, 1992, vol. 11, 1513 - 1524 [0151]

• **CHOI; CHEN; KRIEGLER; RONINSON.** An altered pattern of cross-resistance in multi-drug-resistant human cells results from spontaneous mutations in the mdr-1 (p-glycoprotein) gene. *Cell*, 1988, vol. 53, 519 [0151]

• **COCEA.** Duplication of a region in the multiple cloning site of a plasmid vector to enhance cloning-mediated addition of restriction sites to a DNA fragment. *Biotechniques*, 1997, vol. 23, 814 - 816 [0151]

• **COHEN; WALTER; LEVINSON.** A Repetitive Sequence Element 3' of the Human c-Ha-ras1 Gene Has Enhancer Activity. *J. Cell. Physiol.*, 1987, vol. 5, 75 [0151]

• **CORBEAU** y colaboradores. *PNAS (U.S.A.)*, 1996, vol. 93 (24), 14070 - 14075 [0151]

• **COSTA; LAI; GRAYSON; DAMELL.** The Cell-Specific Enhancer of the Mouse Transthyretin (Prealbumin) Gene Binds a Common Factor at One Site and a Liver-Specific Factor(s) at Two Other Sites. *Mol. Cell. Biol.*, 1988, vol. 8, 81 [0151]

• **CRIFE; HAUGEN; TURK; TABATABAI; SCHMID; DURST; GISSMANN; ROMAN; TUREK.** Transcriptional Regulation of the Human Papilloma Virus-16 E6-E7 Promoter by a Keratinocyte-Dependent Enhancer, and by Viral E2 Trans-Activator and Repressor Gene Products: Implications for Cervical Carcinogenesis. *EMBO J.*, 1987, vol. 6, 3745 [0151]

• **CULOTTA; HAMER.** Fine Mapping of a Mouse Metallothionein Gene Metal-Response Element. *Mol. Cell. Biol.*, 1989, vol. 9, 1376 [0151]

• **DANDOLO; BLANGY; KAMEN.** Regulation of Polyma Virus Transcription in Murine Embryonal Carcinoma Cells. *J. Virology*, 1983, vol. 47, 55 [0151]

• **DAS; KLAVER; KLASSENS; VAN WAMEL.** A conserved hairpin motif in the R-U5 region of the human immunodeficiency virus 1 RNA genome is essential for replication. *J. Virol.*, vol. 71, 2346 - 2356 [0151]

• **DAO; HANNUM; KOHN; NOLTA.** FLT3 ligand preserves the ability of human CD34+ progenitors to sustain long-term hematopoiesis in immune-deficient mice after *ex vivo* retroviral-mediated transduction. *Blood*, 1997, vol. 89, 446 - 456 [0151]

• **DAO; HASHINO; KATO; NOLTA.** Adhesion to fibronectina maintains regenerative capacity during *ex vivo*, culture and transduction of human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*, 1998, vol. 92, 4612 - 4621 [0151]

• **DESCHAMPS; MEIJLINK; VERMA.** Identification of a Transcriptional Enhancer Element Upstream From the Proto-Oncogene Fos. *Science*, 1985, vol. 230, 1174 [0151]

• **DE VILLIERS; SCHAFFNER; TYNDALL; LUPTON; KAMEN.** Polyoma Virus DNA Replication Requires an Enhancer. *Nature*, 1984, vol. 312, 242 [0151]

• **DEZAZZO; KILPATRICK; IMPERIALE.** Involvement of long terminal repeat U3 sequences overlapping the transcription control region in human immunodeficiency virus type 1 mRNA 3' end formation. *Mol. Cell. Biol.*, 1998, vol. 11, 1624 - 1630 [0151]

• **DONELLO; LOEB; HOPE.** Woodchuck hepatitis virus contains a tripartite posttranscriptional regulatory element. *J. Virol.*, 1998, vol. 72, 5085 - 5092 [0151]

- **DORRELL; GAN; PEREIRA; HAWLEY; DICK.** Expansion of human cord blood CD34(+)CD38(-) cells in *ex vivo* culture during retroviral transduction without a corresponding increase in SCID repopulating cell (SRC) frequency: dissociation of SRC phenotype and function. *Blood*, 2000, vol. 95, 102 - 110 [0151]
- 5 • **DULL; ZUFFEREY; KELLY; MANDEL; NGUYEN; TRONO; NALDINI.** A third generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J. Virol.*, 1998, vol. 72, 8463 - 8471 [0151]
- **EDBROOKE; BURT; CHESHIRE; WOO.** Identification of cis-acting sequences responsible for phorbol ester induction of human serum amyloid A gene expression via a nuclear-factor-kappa β -like transcription factor. *Mol. Cell. Biol.*, 1989, vol. 9, 1908 [0151]
- 10 • **EDLUND; WALKER; BARR; RUTTER.** Cell-specific expression of the rat insulin gene: evidence for role of two distinct 5' flanking elements. *Science*, 1985, vol. 230, 912 [0151]
- 15 • **FECHHEIMER; BOYLAN; PARKER; SISKEN; PATEL; ZIMMER.** Transfection of mammalian cells with plasmid DNA by scrape loading and sonication loading. *Proc Nat'l. Acad. Sci. USA*, 1987, vol. 84, 8463 - 8467 [0151]
- **FENG; HOLLAND.** HIV-I Tat Trans-Activation Requires the Loop Sequence Within Tar. *Nature*, 1988, vol. 334, 6178 [0151]
- 20 • **FIRAK; SUBRAMANIAN.** Minimal Transcription Enhancer of Simian Virus 40 is a 74-Base-Pair Sequence that Has Interacting Domains. *Mol. Cell. Biol.*, 1986, vol. 6, 3667 [0151]
- **FOECKING; HOFSTETTER.** Powerful and Versatile Enhancer-Promoter Unit for Mammalian Expression Vectors. *Gene*, 1986, vol. 45 (1), 101 - 105 [0151]
- 25 • **FROEHLER; NG; MATTEUCCI.** Synthesis of DNA via deoxynucleoside H-phosphonate intermediates. *Nuc. Acids Res.*, 1986, vol. 14, 5399 - 407 [0151]
- 30 • **FUJITA; SHIBUYA; HOTTA; YAMANISHI; TANIGUCHI.** Interferon-Beta Gene Regulation: Tandemly Repeated Sequences of a Synthetic 6-bp Oligomer Function as a Virus-Inducible Enhancer. *Cell*, 1987, vol. 49, 357 [0151]
- **GILLES; MORRIS; OI; TONEGAWA.** A tissue-specific transcription enhancer element is located in the major intron of a rearranged immunoglobulin heavy-chain gene. *Cell*, 1983, vol. 33, 717 [0151]
- 35 • **GILMARTIN; FLEMING; OETJEN.** Activation of HIV-1 pre-mRNA 3' processing *in vitro* requires both an upstream element and TAR. *Embo. J.*, 1992, vol. 11, 4419 - 4428 [0151]
- 40 • **GLOSS; BERNARD; SEEDORF; KLOCK.** The Upstream Regulatory Region of the Human Papilloma Virus-16 Contains an E2 Protein-Independent Enhancer Which is Specific for Cervical Carcinoma Cells and Regulated by Glucocorticoid Hormones. *EMBO J.*, 1987, vol. 6, 3735 [0151]
- **GODBOUT; INGRAM; TILGHMAN.** Fine-Structure Mapping of the Three Mouse Alpha-Fetoprotein Gene Enhancers. *Mol. Cell. Biol.*, 1988, vol. 8, 1169 [0151]
- 45 • **GOODBOURN; BURSTEIN; MANIATIS.** The Human Beta-Interferon Gene Enhancer is Under Negative Control. *Cell*, 1986, vol. 45, 601 [0151]
- 50 • **GOODBOURN; MANIATIS.** Overlapping Positive and Negative Regulatory Domains of the Human β -Interferon Gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, vol. 85, 1447 [0151]
- **GOPAL.** Gene transfer method for transient gene expression, stable transformation, and cotransformation of suspension cell cultures. *Mol. Cell. Biol.*, 1985, vol. 5, 1188 - 1190 [0151]
- 55 • **GOSSEN; BUJARD.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1992, vol. 89, 5547 - 5551 [0151]
- **GRAHAM; VAN DER EB.** A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology*, 1973, vol. 52, 456 - 467 [0151]
- 60 • **GRECO; DACHS.** Gene directed enzyme/prodrug therapy of cancer: historical appraisal and future perspectives. *J. Cell. Phys.*, 2001, vol. 187, 22 - 36 [0151]
- **GREENE; BOHNLEIN; BALLARD.** HIV-1, and Normal T-Cell Growth: Transcriptional Strategies and Surprises. *Immunology Today*, 1989, vol. 10, 272 [0151]
- 65 • **GROSSCHEDL; BALTIMORE.** Cell-Type Specificity of Immunoglobulin Gene Expression is Regulated by at Least Three DNA Sequence Elements. *Cell*, 1985, vol. 41, 885 [0151]

- **HASLINGER; KARIN.** Upstream Promoter Element of the Human Metallothionein-II Gene Can Act Like an Enhancer Element. *Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1985, vol. 82, 8572 [0151]
- **HAUBER; CULLEN.** Mutational Analysis of the Trans-Activation-Responsive Region of the Human Immunodeficiency Virus Type I Long Terminal Repeat. *J. Virology*, 1988, vol. 62, 673 [0151]
- **HEN; BORRELLI; FROMENTAL; SASSONECORSI; CHAMBON.** A Mutated Polyoma Virus Enhancer Which is Active in Undifferentiated Embryonal Carcinoma Cells is not Repressed by Adenovirus-2 E1A Products. *Nature*, 1986, vol. 321, 249 [0151]
- **HENSEL; MEICHLE; PFIZENMAIER; KRONKE.** PMA-Responsive 5' Flanking Sequences of the Human TNF Gene. *Lymphokine Res.*, 1989, vol. 8, 347 [0151]
- **HERR; CLARKE.** The SV40 Enhancer is Composed of Multiple Functional Elements That Can Compensate for One Another. *Cell*, 1986, vol. 45, 461 [0151]
- **HIROCHIKA; BROWKER; CHOW.** Enhancers and Trans-Acting E2 Transcriptional Factors of Papilloma Viruses. *J. Virol.*, 1987, vol. 61, 2599 [0151]
- **HIRSCH; GAUGLER; DEAGOSTINI-BAUZIN; BALLY-CUIF; GORDIS.** Identification of Positive and Negative Regulatory Elements Governing Cell-Type-Specific Expression of the Neural-Cell-Adhesion-Molecule Gene. *Mol. Cell. Biol.*, 1990, vol. 10, 1959 [0151]
- **HOLBROOK; GULINO; RUSCETTI.** cis-Acting Transcriptional Regulatory Sequences in the Gibbon Ape Leukemia Virus (GALV) Long Terminal Repeat. *Virology*, 1987, vol. 157, 211 [0151]
- **HORLICK; BENFIELD.** The upstream muscle-specific enhancer of the rat muscle creatine kinase gene is composed of multiple elements. *Mol. Cell. Biol.*, 1989, vol. 9, 2396 [0151]
- **HUANG; OSTROWSKI; BERARD; HAGAR.** Glucocorticoid regulation of the ha-musv p21 gene conferred by sequences from mouse mammary tumor virus. *Cell*, 1981, vol. 27, 245 [0151]
- **HUG; COSTAS; STAEHEL; AEBI; WEISSMANN.** Organization of the Murine Mx Gene and Characterization of its Interferon- and Virus-Inducible Promoter. *Mol. Cell. Biol.*, 1988, vol. 8, 3065 [0151]
- **HWANG; LIM; CHAE.** Characterization of the S-Phase-Specific Transcription Regulatory Elements in a DNA-Replication-Independent Testis-Specific H2B (TH2B) Histone Gene. *Mol. Cell. Biol.*, 1990, vol. 10, 585 [0151]
- **IMAGAWA; CHIU; KARIN.** Transcription Factor AP-2 Mediates Induction by Two Different Signal-Transduction Pathways: Protein Kinase C and cAMP. *Cell*, 1987, vol. 51, 251 [0151]
- **IMBRA; KARIN.** Phorbol Ester Induces the Transcriptional Stimulatory Activity of the SV40 Enhancer. *Nature*, 1986, vol. 323, 555 [0151]
- **IMLER; LEMAIRE; WASVLYK; WASLYK.** Negative Regulation Contributes to Tissue Specificity of the Immunoglobulin Heavy-Chain Enhancer. *Mol. Cell. Biol.*, 1987, vol. 7, 2558 [0151]
- **IMPERIALE; NEVINS.** Adenovirus 5 E2 Transcription Unit: an E1A-Inducible Promoter with an Essential Element that Functions Independently of Position or Orientation. *Mol. Cell. Biol.*, 1984, vol. 4, 875 [0151]
- **JAKOBOVITS; SMITH; JAKOBOVITS; CAPON.** A Discrete Element 3' of Human Immunodeficiency Virus 1 (HIV-1) and HIV-2 mRNA Initiation Sites Mediates Transcriptional Activation by an HIV Trans-Activator. *Mol. Cell. Biol.*, 1988, vol. 8, 2555 [0151]
- **JAMEEL; SIDDIQUI.** The Human Hepatitis B Virus Enhancer Requires Transacting Cellular Factor(s) for Activity. *Mol. Cell. Biol.*, 1986, vol. 6, 710 [0151]
- **JAYNES; JOHNSON; BUSKIN; GARTSIDE; HAUSCHKA.** The Muscle Creatine Kinase Gene is Regulated by Multiple Upstream Elements, Including a Muscle-Specific Enhancer. *Mol. Cell. Biol.*, 1988, vol. 8, 62 [0151]
- **JOHNSON; WOLD; HAUSCHKA.** Muscle creatine kinase sequence elements regulating skeletal and cardiac muscle expression in transgenic mice. *Mol. Cell. Biol.*, 1989, vol. 9, 3393 [0151]
- **KADESCH; BERG.** Effects of the Position of the Simian Virus 40 Enhancer on Expression of Multiple Transcription Units in a Single Plasmid. *Mol. Cell. Biol.*, 1986, vol. 6, 2593 [0151]
- **KAFRI y colaboradores.** Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors. *Nat. Genetics*, 1997, vol. 17, 314 - 317 [0151]

- **KARIN; HASLINGER; HEGUY; DIETLIN; COOKE.** Metal-Responsive Elements Act as Positive Modulators of Human Metallothionein-IIA Enhancer Activity. *Mol. Cell. Biol.*, 1987, vol. 7, 606 [0151]
- **KATINKA; YANIV; VASSEUR; BLANGY.** Expression of Polyoma Early Functions in Mouse Embryonal Carcinoma Cells Depends on Sequence Rearrangements in the Beginning of the Late Region. *Cell*, 1980, vol. 20, 393 [0151]
- **KAWAMOTO; MAKINO; NIW; SUGIYAMA; KIMURA; ANEMURA; NAKATA; KAKUNAGA.** Identification of the Human Beta-Actin Enhancer and its Binding Factor. *Mol. Cell. Biol.*, 1988, vol. 8, 267 [0151]
- **KILEDJIAN; SU; KADESCH.** Identification and characterization of two functional domains within the murine heavy-chain enhancer. *Mol. Cell. Biol.*, 1988, vol. 8, 145 [0151]
- **KLAGES; ZUFFEREY; TRONO.** A stable system for the high-titer production of multiply aattenuated lentiviral vectors. *Mol. Ther.*, 2000, vol. 2, 170 - 176 [0151]
- **KLAMUT; GANGOPADYHAY; WORTON; RAY.** Molecular and Functional Analysis of the Muscle-Specific Promoter Region of the Duchenne Muscular Dystrophy Gene. *Mol. Cell. Biol.*, 1990, vol. 10, 193 [0151]
- **KLEIN y colaboradores.** High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature*, 1987, vol. 327, 70 - 73 [0151]
- **KOCH; BENOIST; MATHIS.** Anatomy of a new β -cell-specific enhancer. *Mol. Cell. Biol.*, 1989, vol. 9, 303 [0151]
- **KOHN; NOLTA; WEINTHAL; BAHNER; YU; LILLEY; CROOKS.** Toward gene therapy for Gaucher disease. *Hum. Gene Ther.*, 1991, vol. 2, 101 - 105 [0151]
- **KOTSOPOULOU; KIM; KINGSMAN; KINGSMAN; MITROPHANOUS.** A Rev-independent human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-based vector that exploits a codon-optimized HIV-1 gag-pol gene. *J. Virol.*, 2000, vol. 74, 4839 - 52 [0151]
- **KRAUS y colaboradores.** Alternative promoter usage and tissue specific expression of the mouse somatostatin receptor 2 gene. *FEBS Lett.*, 1998, vol. 428 (3), 165 - 170 [0151]
- **A retrovirus LTR contains a new type of eukaryotic regulatory element. KRIEGLER; BOTCHAN.** Eukaryotic Viral Vectors. *Cold Spring Harbor Laboratory*, 1982 [0151]
- **Promoter substitution and enhancer augmentation increases the penetrance of the sv40 a gene to levels comparable to that of the harvey murine sarcoma virus ras gene in morphologic transformation. KRIEGLER y colaboradores.** *Gene Expression*. 1983 [0151]
- **Viral Integration and Early Gene Expression Both Affect the Efficiency of SV40 Transformation of Murine Cells: Biochemical and Biological Characterization of an SV40 Retrovirus. KRIEGLER y colaboradores.** Cancer Cells 2/Oncogenes and Viral Genes. *Cold Spring Harbor Laboratory*, 1984 [0151]
- **KRIEGLER; PEREZ; DEFAY; ALBERT; LIU.** A Novel Form of TNF/Cachectin Is a Cell-Surface Cytotoxic Transmembrane Protein: Ramifications for the Complex Physiology of TNF. *Cell*, 1988, vol. 53, 45 [0151]
- **KUHL; DE LA FUENTA; CHATURVEDI; PARINOO; RYALS; MEYER; WEISSMAN.** Reversible Silencing of Enhancers by Sequences Derived From the Human IFN-alpha Promoter. *Cell*, 1987, vol. 50, 1057 [0151]
- **KUNZ; ZIMMERMAN; HEISIG; HEINRICH.** Identification of the Promoter Sequences Involved in the Interleukin-6-Dependent Expression of the Rat Alpha-2-Macroglobulin Gene. *Nucl. Acids Res.*, 1989, vol. 17, 1121 [0151]
- **LAREYRE y colaboradores** A5-kilobase pair promoter fragment of the murine epididymal retinoic acid-binding protein gene drives the tissue-specific, cell-specific, and androgen-regulated expression of a foreign gene in the epididymis of transgenic mice. *J Biol Chem.*, 1999, vol. 274 (12), 8282 - 8290 [0151]
- **LARSEN; HARNEY; MOORE.** Repression medaites cell-type-specific expression of the rat growth hormone gene. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.*, 1986, vol. 83, 8283 [0151]
- **LASPIA; RICE; MATHEWS.** HIV-1 Tat protein increases transcriptional initiation and stabilizes elongation. *Cell*, 1989, vol. 59, 283 [0151]
- **LATIMER; BERGER; BAUMANN.** Highly conserved upstream regions of the alpha..sub.1-antitrypsin gene in two mouse species govern liver-specific expression by different mechanisms. *Mol. Cell. Biol.*, 1990, vol. 10, 760 [0151]

- **LEE; MULLIGAN; BERG; RINGOLD.** Glucocorticoids Regulate Expression of Dihydrofolate Reductase cDNA in Mouse Mammary Tumor Virus Chimaeric Plasmids. *Nature*, 1981, vol. 294, 228 [0151]
- **LEE y colaboradores** Activation of beta3-adrenoceptors by exogenous dopamine to lower glucose uptake into rat adipocytes. *J Auton Nerv Syst.*, 1997, vol. 74 (2-3), 86 - 90 [0151]
- **LEVENSON y colaboradores.** Internal ribosomal entry site-containing retroviral vectors with green fluorescent protein and drug resistance markers. *Human Gene Therapy*, 1998, vol. 9, 1233 - 1236 [0151]
- **LEVINSON; KHOURY; VANDEWOUE; GRUSS.** Activation of SV40 Genome by 72-Base-Pair Tandem Repeats of Moloney Sarcoma Virus. *Nature*, 1982, vol. 295, 79 [0151]
- **LEWIS; EMERMAN.** Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus. *J. Virol.*, 1994, vol. 68, 510 - 516 [0151]
- **LIN; CROSS; HALDEN; DRAGOS; TOLEDANO; LEONARD.** Delineation of an enhancerlike positive regulatory element in the interleukin-2 receptor alpha.-chain gene. *Mol. Cell. Biol.*, 1990, vol. 10, 850 [0151]
- **LURIA; GROSS; HOROWITZ; GIVOL.** Promoter Enhancer Elements in the Rearranged Alpha-Chain Gene of the Human T-Cell Receptor. *EMBO J.*, 1987, vol. 6, 3307 [0151]
- **LUSKY; BERG; WEIHER; BOTCHAN.** Bovine Papilloma Virus Contains an Activator of Gene Expression at the Distal End of the Early Transcription Unit. *Mol. Cell. Biol.*, 1983 [0151]
- **LUSKY; BOTCHAN.** Transient Replication of Bovine Papilloma Virus Type 1 Plasmids: cis and trans Requirements. *Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1986, vol. 83, 3609 [0151]
- **MAJORS; VARMUS.** A Small Region of the Mouse Mammary Tumor Virus Long Terminal Repeat Confers Glucocorticoid Hormone Regulation on a Linked Heterologous Gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1983, vol. 80, 5866 [0151]
- **MARTHAS y colaboradores.** *J. Virol.*, 1993, vol. 67, 6047 - 6055 [0151]
- **MAZURIER; MOREAU-GAUDRY; MAGUERSATTA; SALESSE; PIGEONNIER-LAGARDE; GED; BELLOC; LACOMBE; MAHON; REIFFERS.** Rapid analysis and efficient selection of human transduced primitive hematopoietic cells using the humanized S65T green fluorescent protein. *Gene Ther.*, 1998, vol. 5, 556 - 562 [0151]
- **MCNEALL; SANCHEZ; GRAY; CHESTERMAN; SLEIGH.** Hyperinducible Gene Expression From a Metallothionein Promoter Containing Additional Metal-Responsive Elements. *Gene*, 1989, vol. 76, 81 [0151]
- **MIKSICEK; HEBER; SCHMID; DANESCH; POSSECKERT; BEATO; SCHUTZ.** Glucocorticoid Responsiveness of the Transcriptional Enhancer of Moloney Murine Sarcoma Virus. *Cell*, 1986, vol. 46, 203 [0151]
- **MIYOSHI; SMITH; MOSIER; VERMA; TORBETT.** Transduction of human CD34+ cells that mediate long-term engraftment of NOD/SCID mice by HIV vectors. *Science*, 1999, vol. 283, 682 - 686 [0151]
- **MIZUSHIMA; NAGATA.** pEF-BOS, a powerful mammalian expression vector. *Nucleic Acids Res.*, 1990, vol. 18, 5322 [0151]
- **MORDACQ; LINZER.** Co-localization of Elements Required for Phorbol Ester Stimulation and Glucocorticoid Repression of Proliferin Gene Expression. *Genes and Dev.*, 1989, vol. 3, 760 [0151]
- **MOREAU; HEN; WASYLYK; EVERETT; GAUB; CHAMBON.** The SV40 base-repair repeat has a striking effect on gene expression both in sv40 and other chimeric recombinants. *Nucl. Acids Res.*, 1981, vol. 9, 6047 [0158]
- **MUESING y colaboradores.** *Cell*, 1987, vol. 48, 691 [0151]
- **NALDINI; BLOMER; GALLAY; ORY; MULLIGAN; GAGE; VERMA; TRONO.** *In vivo* gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*, 1996, vol. 272, 263 - 267 [0151]
- **NALDINI; BLOMER; GAGE; TRONO; VERMA.** Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, vol. 93, 11382 - 11388 [0151]
- **NALDINI.** Lentiviruses as gene transfer agents for delivery to non-dividing cells. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 1998, vol. 9, 457 - 463 [0151]

- **NG; GUNNING; LIU; LEAVITT; KEDES.** Regulation of the Human Beta-Actin Promoter by Upstream and Intron Domains. *Nuc. Acids Res.*, 1989, vol. 17, 601 [0151]
- **NOMOTO y colaboradores.** Cloning and characterization of the alternative promoter regions of the human LIMK2 gene responsible for alternative transcripts with tissue-specific expression. *Gene*, 1999, vol. 236 (2), 259 - 271 [0151]
- **OMITZ; HAMMER; DAVISON; BRINSTER; PALMITER.** Promoter and enhancer elements from the rat elastase i gene function independently of each other and of heterologous enhancers. *Mol. Cell. Biol.*, 1987, vol. 7, 3466 [0151]
- **ONDEK; SHEPPARD; HERR.** Discrete Elements Within the SV40 Enhancer Region Display Different Cell-Specific Enhancer Activities. *EMBO J.*, 1987, vol. 6, 1017 [0151]
- **ORY y colaboradores.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1996, vol. 93, 11400 - 11406 [0151]
- **PALMITER; CHEN; BRINSTER.** Differential regulation of metallothionein-thymidine kinase fusion genes in transgenic mice and their offspring. *Cell*, 1982, vol. 29, 701 [0151]
- **PECH; RAO; ROBBINS; AARONSON.** Functional identification of regulatory elements within the promoter region of platelet-derived growth factor 2. *Mol. Cell. Biol.*, 1989, vol. 9, 396 [0151]
- **PEREZ-STABLE; CONSTANTINI.** Roles of fetal γ -globin promoter elements and the adult β -globin 3' enhancer in the stage-specific expression of globin genes. *Mol. Cell. Biol.*, 1990, vol. 10, 1116 [0151]
- **PIACIBELLO; SANAVIO; SEVERINO; DANE; GAMMAITONI; FAGIOLI; PERISSINOTTO; CAVALLONI; KOLLET; LAPIDOT.** Engraftment in nonobese diabetic severe combined immunodeficient mice of human CD34(+) cord blood cells after *ex vivo* expansion: evidence for the amplification and self-renewal of repopulating stem cells. *Blood*, 1999, vol. 93, 3736 - 3749 [0151]
- **PICARD; SCHAFFNER.** A Lymphocyte-Specific Enhancer in the Mouse Immunoglobulin Kappa Gene. *Nature*, 1984, vol. 307, 83 [0151]
- **PINKERT; OMITZ; BRINSTER; PALMITER.** An albumin enhancer located 10 kb upstream functions along with its promoter to direct efficient, liver-specific expression in transgenic mice. *Genes and Dev.*, 1987, vol. 1, 268 [0151]
- **PONTA; KENNEDY; SKROCH; HYNES; GRONER.** Hormonal Response Region in the Mouse Mammary Tumor Virus Long Terminal Repeat Can Be Dissociated From the Proviral Promoter and Has Enhancer Properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1985, vol. 82, 1020 [0151]
- **PORTON; ZALLER; LIEBERSON; ECKHARDT.** Immunoglobulin heavy-chain enhancer is required to maintain transfected .gamma.2a gene expression in a pre-b-cell line. *Mol. Cell. Biol.*, 1990, vol. 10, 1076 [0151]
- **POTTER y colaboradores.** Enhancer-dependent expression of human k immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation. *Proc Nat'l Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 81, 7161 - 7165 [0151]
- **QUEEN; BALTIMORE.** Immunoglobulin Gene Transcription is Activated by Downstream Sequence Elements. *Cell*, 1983, vol. 35, 741 [0151]
- **QUINN; FARINA; GARDNER; KRUTZSCH; LEVENS.** Multiple components are required for sequence recognition of the ap1 site in the gibbon ape leukemia virus enhancer. *Mol. Cell. Biol.*, 1989, vol. 9, 4713 [0151]
- **REDONDO; HATA; BROCKLEHURST; KRANGEL.** A T-Cell-Specific Transcriptional Enhancer Within the Human T-Cell Receptor .delta. Locus. *Science*, 1990, vol. 247, 1225 [0151]
- **RESENDEZ JR.; WOODEN; LEE.** Identification of highly conserved regulatory domains and protein-binding sites in the promoters of the rat and human genes encoding the stress-inducible 78-kilodalton glucose-regulated protein. *Mol. Cell. Biol.*, 1988, vol. 8, 4579 [0151]
- **REISMAN; ROTTER.** Induced Expression From the Moloney Murine Leukemia Virus Long Terminal Repeat During Differentiation of Human Myeloid Cells is Mediated Through its Transcriptional Enhancer. *Mol. Cell. Biol.*, 1989, vol. 9, 3571 [0151]
- **RIPE; LORENZEN; BRENNER; BREINDL.** Regulatory elements in the 5' flanking region and the first intron contribute to transcriptional control of the mouse alpha-1-type collagen gene. *Mol. Cell. Biol.*, 1989, vol. 9, 2224 [0151]

- **RIPPE; BRENNER; LEFFERT.** DNA-mediated gene transfer into adult rat hepatocytes in primary culture. *Mol. Cell Biol.*, 1990, vol. 10, 689 - 695 [0151]
- **RITTLING; COUTINHO; AMARM; KOLBE.** AP-1/jun-binding Sites Mediate Serum Inducibility of the Human Vimentin Promoter. *Nuc. Acids Res.*, 1989, vol. 17, 1619 [0151]
- **ROE; REYNOLDS; YU; BROWN.** Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. *Embo. J.*, 1993, vol. 12, 2099 - 2108 [0151]
- **ROSEN; SODROSKI; HASELTINE.** The location of cis-acting regulatory sequences in the human t-cell lymphotropic virus type III (HTLV-111/LAV) long terminal repeat. *Cell*, 1988, vol. 41, 813 [0151]
- **SAKAI; HELMS; CARLSTEDT-DUKE; GUSTAFSSON; ROTTMAN; YAMAMOTO.** Hormone-Mediated Repression: A Negative Glucocorticoid-Response Element From the Bovine Prolactin Gene. *Genes and Dev.*, 1988, vol. 2, 1144 [0151]
- **SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS.** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1989, vol. 1, 19 - 17.29 [0151]
- **SATAKE; FURUKAWA; ITO.** Biological activities of oligonucleotides spanning the f9 point mutation within the enhancer region of polyoma virus DNA. *J. Virology*, 1988, vol. 62, 970 [0151]
- **SCHARFINANN; AXELROD; VERMA.** Long-term *in vivo* expression of retrovirus-mediated gene transfer in mouse fibroblast implants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 88, 4626 - 4630 [0151]
- **SCHAFFNER; SCHIRM; MULLER-BADEN; WEVER; SCHAFFNER.** Redundancy of Information in Enhancers as a Principle of Mammalian Transcription Control. *J. Mol. Biol.*, 1988, vol. 201, 81 [0151]
- **SCHMID; UITTENBOGAART; KELD; GIORGI.** A rapid method for measuring apoptosis and dual-color immunofluorescence by single laser flow cytometry. *J. Immunol. Methods*, 1994, vol. 170, 145 - 157 [0151]
- **SEARLE; STUART; PALMITER.** Building a metal-responsive promoter with synthetic regulatory elements. *Mol. Cell. Biol.*, 1985, vol. 5, 1480 [0151]
- **SHARP; MARCINIAK.** HIV Tar: an RNA Enhancer?. *Cell*, 1989, vol. 59, 229 [0151]
- **SHAUL; BEN-LEVY.** Multiple Nuclear Proteins in Liver Cells are Bound to Hepatitis B Virus Enhancer Element and its Upstream Sequences. *EMBO J.*, 1987, vol. 6, 1913 [0151]
- **SHERMAN; BASTA; MOORE; BROWN; TING.** Class II Box Consensus Sequences in the HLA-DR.alpha. Gene: Transcriptional Function and Interaction with Nuclear Proteins. *Mol. Cell. Biol.*, 1989, vol. 9, 50 [0151]
- **SLEIGH; LOCKETT.** SV40 Enhancer Activation During Retinoic-Acid-Induced Differentiation of F9 Embryonal Carcinoma Cells. *J. EMBO*, 1985, vol. 4, 3831 [0151]
- **SPALHOLZ; YANG; HOWLEY.** Transactivation of a Bovine Papilloma Virus Transcriptional Regulatory Element by the E2 Gene Product. *Cell*, 1985, vol. 42, 183 [0151]
- **SPANDAU; LEE.** Trans-Activation of Viral Enhancers by the Hepatitis B Virus X Protein. *J. Virology*, 1988, vol. 62, 427 [0151]
- **SPANDIDOS; WILKIE.** Host-Specificities of Papilloma Virus, Moloney Murine Sarcoma Virus and Simian Virus 40 Enhancer Sequences. *EMBO J.*, 1983, vol. 2, 1193 [0151]
- **STEPHENS; HENTSCHEL.** The Bovine Papilloma Virus Genome and its Uses as a Eukaryotic Vector. *Biochem. J.*, 1987, vol. 248, 1 [0151]
- **STUART; SEARLE; PALMITER.** Identification of Multiple Metal Regulatory Elements in Mouse Metallothionein-I Promoter by Assaying Synthetic Sequences. *Nature*, 1985, vol. 317, 828 [0151]
- **SULLIVAN; PETERLIN.** Transcriptional Enhancers in the HLA-DQ Subregion. *Mol. Cell. Biol.*, 1987, vol. 7, 3315 [0151]
- **SUTTON; REITSMA; UCHIDA; BROWN.** Transduction of human progenitor hematopoietic stem cells by human immunodeficiency virus type 1-based vectors is cell cycle dependent. *J. Virol.*, 1999, vol. 73, 3649 - 3660 [0151]

- **SUTTON; WU; RIGG; BOHNLEIN; BROWN.** Human immunodeficiency virus type 1 vectors efficiently transduce human hematopoietic stem cells. *J. Virol.*, 1998, vol. 72, 5781 - 5788 [0151]
- **SWARTZENDRUBER; LEHMAN.** Neoplastic Differentiation: Interaction of Simian Virus 40 and Polyoma Virus with Murine Teratocarcinoma Cells. *J. Cell. Physiology*, 1975, vol. 85, 179 [0151]
- **TAKEBE; SEIKI; FUJISAWA; HOY; YOKOTA; ARAI; YOSHIDA; ARAI.** SR.alpha. Promoter: An Efficient and Versatile Mammalian cDNA Expression System Composed of the Simian Virus 40 Early Promoter and the R-U5 Segment of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Long Terminal Repeat. *Mol. Cell. Biol.*, 1988, vol. 8, 466 [0151]
- **TAYLOR; KINGSTON.** E1A Trans-Activation of Human HSP70 Gene Promoter Substitution Mutants is Independent of the Composition of Upstream and TATA Elements. *Mol. Cell. Biol.*, 1990, vol. 10, 176 [0151]
- **TAYLOR; KINGSTON.** Factor Substitution in a Human HSP70 Gene Promoter: TATA-Dependent and TATA-Independent Interactions. *Mol. Cell. Biol.*, 1990, vol. 10, 165 [0151]
- **TAYLOR; SOLOMON; WEINER; PAUCHA; BRADLEY; KINGSTON.** Stimulation of the Human Heat-Shock Protein 70 Promoter *in vitro* by Simian Virus 40 Large T Antigen. *J. Biol. Chem.*, 1989, vol. 264, 15160 [0151]
- **TAVERNIER; GHEYSEN; DUERINCK; CANDER HEYDEN; FIER.** Deletion Mapping of the Inducible Promoter of Human IFN-beta Gene. *Nature*, 1983, vol. 301, 634 [0151]
- **THIESEN; BOSZE; HENRY; CHARNAY.** A DNA Element Responsible for the Different Tissue Specificities of Friend and Moloney Retroviral Enhancers. *J. Virology*, 1988, vol. 62, 614 [0151]
- **TRONCHE; ROLLIER; BACH; WEISS; YANIV.** The Rat Albumin Promoter: Cooperation with Upstream Elements is Required When Binding of APF/HNF 1 to the Proximal Element is Partially Impaired by Mutation or Bacterial Methylation. *Mol. Cell. Biol.*, 1989, vol. 9, 4759 [0151]
- **TRONCHE; ROLLIER; HERBOMEL; BACH; CEREGHINI; WEISS; YANIV.** Anatomy of the Rat Albumin Promoter. *Mol. Biol. Med.*, 1990, vol. 7, 173 [0151]
- **TRUDEL; CONSTANTINI.** A 3' Enhancer Contributes to the Stage-Specific Expression of the human Beta-Globin Gene. *Genes and Dev.*, 1987, vol. 6, 954 [0151]
- **TSUMAKI y colaboradores.** Modular arrangement of cartilage and neural tissue-specific cis-elements in the mouse alpha2(XI) collagen promoter. *J Biol Chem.*, 1998, vol. 273 (36), 22861 - 22864 [0151]
- **TUR-KASPA; TEICHER; LEVINE; SKOULTCHI; SHAFRITZ.** Use of electroporation to introduce biologically active foreign genes into primary rat hepatocytes. *Mol. Cell Biol.*, 1986, vol. 6, 716 - 718 [0151]
- **TYNDALL; LA MANTIA; THACKER; FAVALORO; KAMEN.** A Region of the Polyoma Virus Genome Between the Replication Origin and Late Protein-Coding Sequences is Required in cis for Both Early Gene Expression and Viral DNA Replication. *Nuc. Acids. Res.*, 1981, vol. 9, 6231 [0151]
- **UCHIDA; SUTTON; FRIERA; HE; REITSMA; CHANG; VERES; SCOLLAY; WEISSMAN.** HIV, but not murine leukemia virus, vectors mediate high efficiency gene transfer into freshly isolated G0/G1 human hematopoietic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, vol. 95, 11939 - 11944 [0151]
- **UEDA; TSUJI; YOSHINO; EBIHARA; YAGASAKI; HISAKAWA; MITSUI; MANABE; TANAKA; KOBAYASHI.** Expansion of human NOD/SCID-repopulating cells by stem cell factor, Flk2/Flt3 ligand, thrombopoietin, IL-6, and soluble IL-6 receptor. *J. Clin. Invest.*, 2000, vol. 105, 1013 - 1021 [0151]
- **UNUTMAZ; KEWAL; RAMANI; MARMON; LITTMAN.** Cytokine signals are sufficient for HIV-1 infection of resting human T lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 1999, vol. 189, 1735 - 1746 [0151]
- **VALSAMAKIS; SCHEK; ALWINE.** Elements upstream of the AAUAAA within the human immunodeficiency virus polyadenylation signal are required for efficient polyadenylation *in vitro*. *Mol. Cell Biol.*, 1992, vol. 12, 3699 - 3705 [0151]
- **VALSAMAKIS; ZEICHNER; CARSWELL; ALWINE.** The human immunodeficiency virus type 1 polyadenylation signal: a 3' long terminal repeat element upstream of the AAUAAA necessary for efficient polyadenylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 88, 2108 - 2112 [0151]
- **VANNICE; LEVINSON.** Properties of the Human Hepatitis B Virus Enhancer: Position Effects and Cell-Type Nonspecificity. *J. Virology*, 1988, vol. 62, 1305 [0151]

• **VASSEUR; KRESS; MONTREAU; BLANGY.** Isolation and Characterization of Polyoma Virus Mutants Able to Develop in Multipotential Murine Embryonal Carcinoma Cells. *Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1980, vol. 77, 1068 [0151]

5 • **WANG; CALAME.** SV40 enhancer-binding factors are required at the establishment but not the maintenance step of enhancer-dependent transcriptional activation. *Cell*, 1986, vol. 47, 241 [0151]

• **WATANABE y colaboradores.** Gene transfection of mouse primordial germ cells *in vitro* and analysis of their survival and growth control. *Experimental Cell Research*, 1997, vol. 230, 76 - 83 [0151]

10 • **WEBER; DE VILLIERS; SCHAFFNER.** An SV40 "Enhancer Trap" Incorporates Exogenous Enhancers or Generates Enhancers From its Own Sequences. *Cell*, 1984, vol. 36, 983 [0151]

15 • **WEINBERGER; JAT; SHARP.** Localization of a Repressive Sequence Contributing to B-cell Specificity in the Immunoglobulin Heavy-Chain Enhancer. *Mol. Cell. Biol.*, 1984, vol. 8, 988 [0151]

• **WINOTO; BALTIMORE.** $\alpha\beta$ -lineage-specific Expression of the $\alpha\beta$ T-Cell Receptor Gene by Nearby Silencers. *Cell*, 1989, vol. 59, 649 [0151]

20 • **WU y colaboradores** Promoter-dependent tissue-specific expressive nature of imprinting gene, insulin-like growth factor II, in human tissues. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, vol. 233 (1), 221 - 226 [0151]

• **WU; WAKEFIELD; LIU; XIAO; KRALOVICS; PRCHAL; KAPPES.** Development of a novel trans-lentiviral vector that affords predictable safety. *Mol. Ther.*, 2000, vol. 2, 47 - 55 [0151]

25 • **YANG; BURKHOLDER; ROBERTS; MARTINELL; MCCABE.** *In vivo* and *in vitro* gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment. *Proc Nat'l Acad Sci. USA*, 1990, vol. 87, 9568 - 9572 [0151]

30 • **YUTZEY; KLINE; KONIECZNY.** An Internal Regulatory Element Controls Troponin I Gene Expression. *Mol. Cell. Biol.*, 1989, vol. 9, 1397 [0151]

• **ZENNOU; PETIT; GUETARD; NERHBASS; MANTAGNIER; CHARNEAU.** HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. *Cell*, 2000, vol. 101, 173 - 185 [0151]

35 • **ZHAO-EMONET y colaboradores.** The equine herpes virus 4 thymidine kinase is a better suicide gene than the human herpes virus 1 thymidine kinase. *Gene Ther.*, 1999, vol. 6 (9), 1638 - 1642 [0151]

40 • **ZUFFEREY; NAGY; MANDEL; NALDINI; TRONO.** Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery *in vivo*. *Nat. Biotechnol.*, 1997, vol. 15, 871 - 875 [0151]

• **ZUFFEREY; DULL; MANDEL; BUKOVSKY; QUIROZ; NALDINI; TRONO.** Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient *in vivo* gene delivery. *J. Virol.*, 1998, vol. 72, 9873 - 9880 [0151]

45 • **ZUFFEREY; DONELLO; TRONO; HOPE.** Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J. Virol.*, 1999, vol. 73, 2886 - 2892 [0151]

• High-titer production of lentiviral vectors. **ZUFFEREY; TRONO.** Current Protocols in Neuroscience. *John Wiley & Sons*, 2000 [0151]

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una glicoproteína quimérica, en donde la glicoproteína quimérica comprende un dominio de cola citoplasmática de MLV-A y un dominio transmembrana y extracelular del virus endógeno de felino RD 114.
2. Un ácido nucleico que codifica a la glicoproteína quimérica de la reivindicación 1.
3. El ácido nucleico de la reivindicación 2, en donde el ácido nucleico incluye la secuencia de la SEQ ID NO: 1.
- 10 4. Una construcción de expresión que comprende al ácido nucleico de la reivindicación 2 ó 3.
5. Una célula recombinante que comprende a la construcción de la reivindicación 4.
- 15 6. Una partícula de un vector que comprende a la glicoproteína quimérica de la reivindicación 1.
7. Una partícula de un vector de la reivindicación 6, en donde la partícula es una partícula de un vector pseudotipado.
- 20 8. La partícula del vector de la reivindicación 6 ó 7, que comprende además una construcción del vector viral recombinante.
9. La partícula del vector de la reivindicación 8, en donde la construcción del vector se deriva de un retrovirus o de un lentivirus.
- 25 10. La partícula del vector de la reivindicación 9, en donde la construcción del vector se deriva de SIV.
11. La partícula del vector de la reivindicación 9, en donde la construcción del vector se deriva de HIV.
- 30 12. La partícula del vector de la reivindicación 8, en donde la construcción del vector comprende además un transgén.
13. La partícula del vector de la reivindicación 12, en donde el transgén es un gen marcador o reportero.
- 35 14. La partícula del vector de la reivindicación 13, en donde el transgén es una proteína fluorescente verde (GFP).
15. La partícula del vector lentiviral de la reivindicación 12, en donde el transgén es un gen terapéutico.
16. La partícula del vector de la reivindicación 15, en donde el transgén es un oncogén o un protooncogén.
- 40 17. La partícula del vector de la reivindicación 15, en donde el transgén es un gen de susceptibilidad a un fármaco.
18. Un método *in vitro* para transducir células que comprende:
 - 45 a) obtener una partícula de un vector pseudotipado de acuerdo con la reivindicación 8; y
 - b) poner en contacto las células que van a ser transducidas con la partícula del vector de (a) bajo condiciones suficientes que conduzcan a una transfección.
- 50 19. El método de la reivindicación 18, que comprende además la etapa de proveer retronectina en una cantidad suficiente para mejorar la transducción.
20. El método de la reivindicación 18 ó 19, en donde las células son células de vertebrado.
- 55 21. El método de la reivindicación 20, en donde las células son células de primate.
22. El método de la reivindicación 20 ó 21, en donde las células son células humanas.
23. El método de la reivindicación 18, en donde las células son células CD34⁺ o PBL.
- 60 24. Un método para producir una partícula de un vector viral pseudotipado recombinante que comprende:
 - (a) transfectar una célula con:
 - 65 (i) al menos una construcción de un vector;
 - (ii) al menos una construcción de empaquetamiento; y

ES 2 326 217 T3

(iii) una construcción de expresión que codifica a una glicoproteína quimérica de la reivindicación 1 para producir una célula productora;

(b) cultivar la célula productora en un medio; y

(c) separar la célula productora del medio para recuperar la partícula del vector viral recombinante del medio.

25. Un método *in vitro* para transducir una célula que comprende poner en contacto a la célula con una partícula de un vector elaborada de acuerdo con la reivindicación 24 y bajo condiciones para efectuar la transducción de la célula por medio del vector recombinante.

26. El método de la reivindicación 25, en donde la célula es una célula humana.

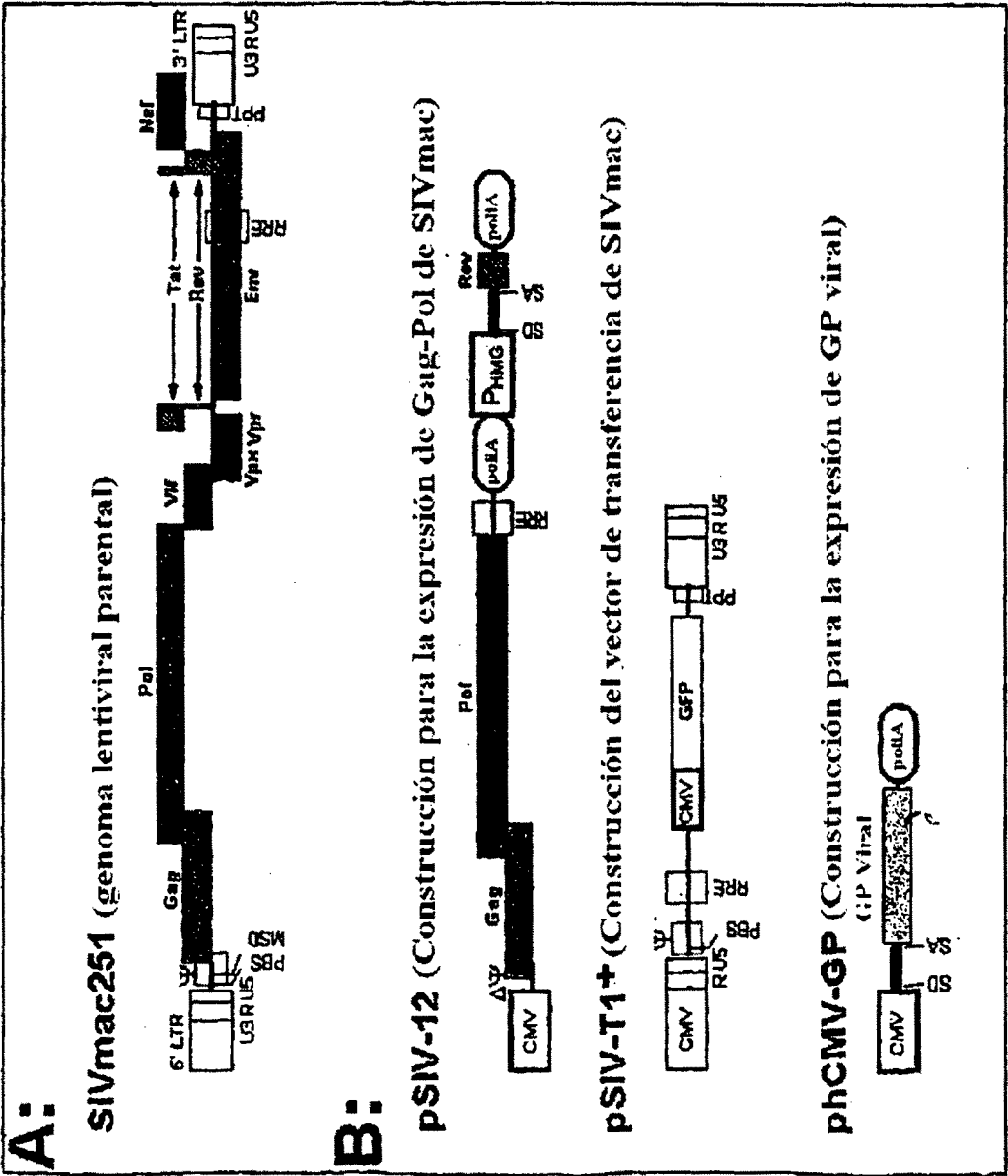
27. El método de la reivindicación 26, en donde la célula es una célula madre hematopoyética.

28. El método de la reivindicación 27, en donde la célula es una célula humana CD34⁺.

29. El método de la reivindicación 27, en donde la célula es tratada para estimular la proliferación celular sin una pérdida sustancial de la pluripotencia de la célula madre.

30. El uso de un vector lentiviral de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15 - 17 para la elaboración de un medicamento concebido para el tratamiento de un trastorno hematopoyético o linfo-hematopoyético.

FIG.1



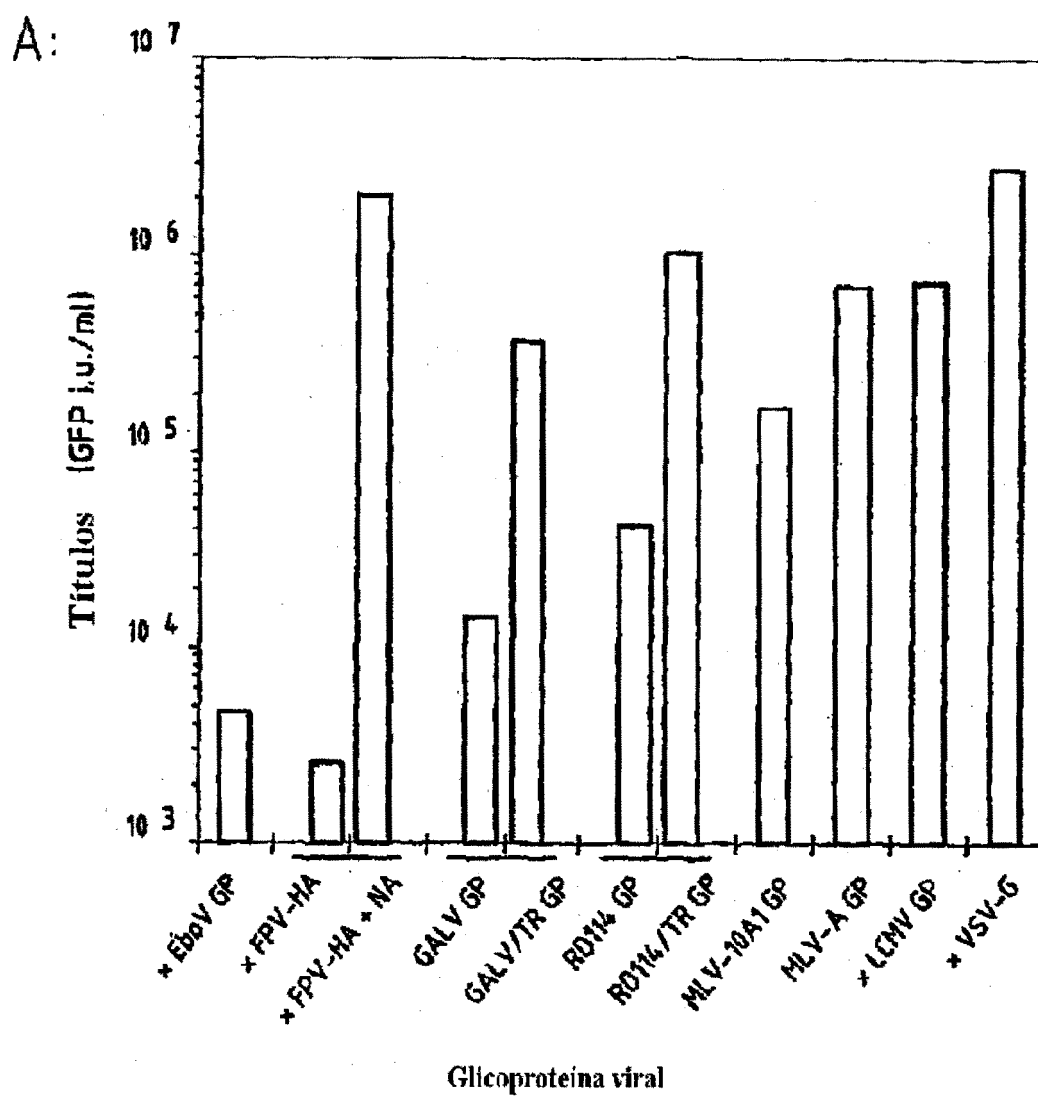


FIG.2 (debut)

B: C:

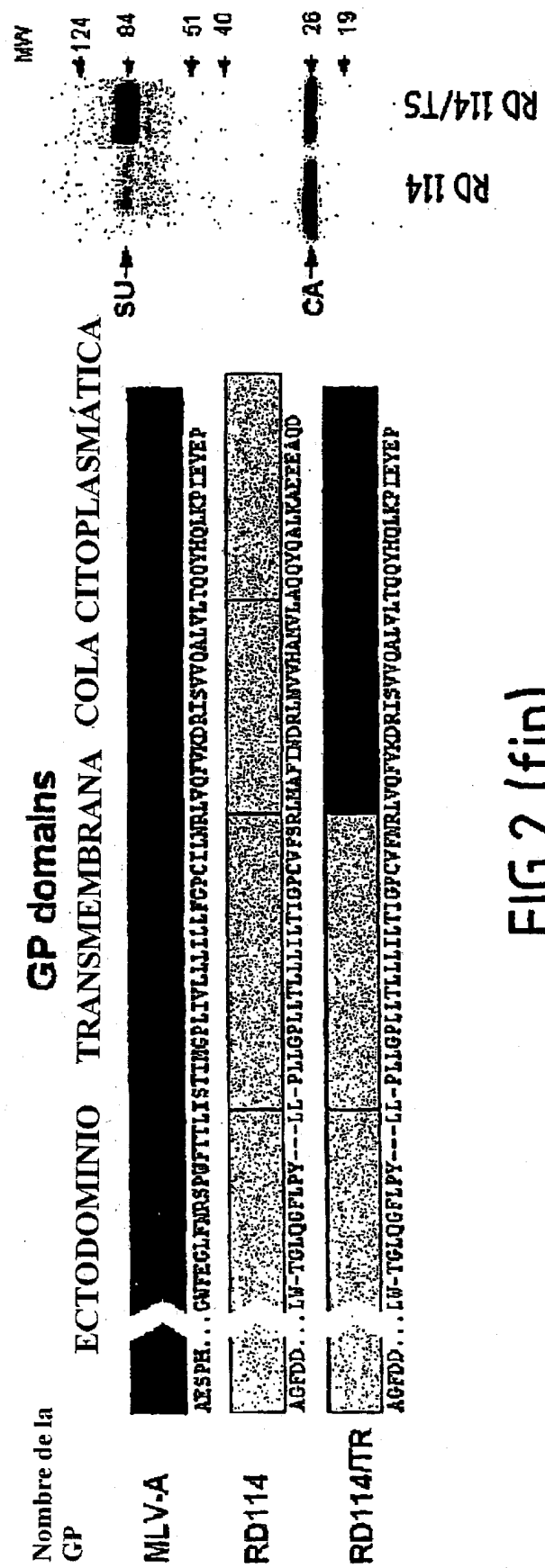


FIG.2 (fin)

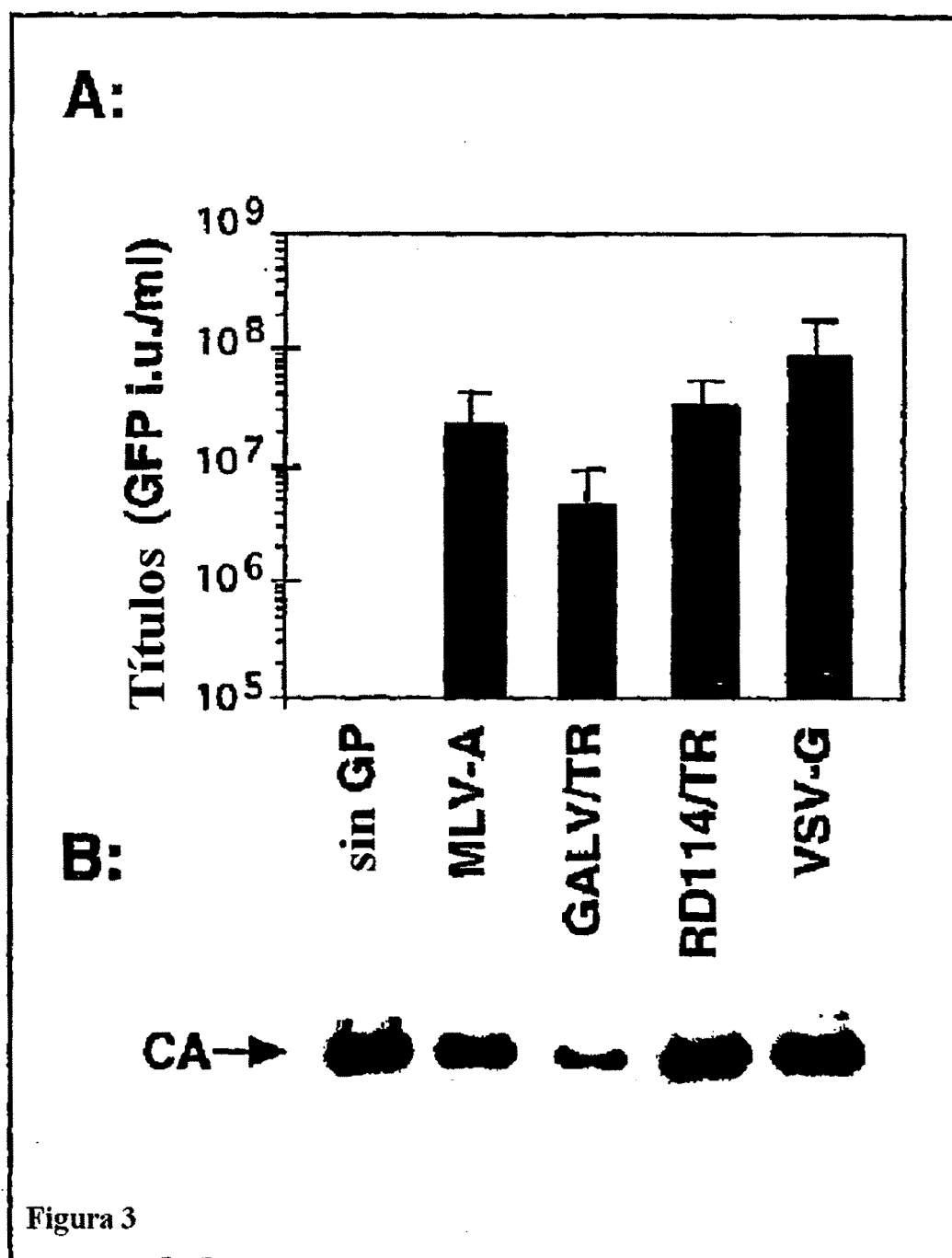


FIG. 3

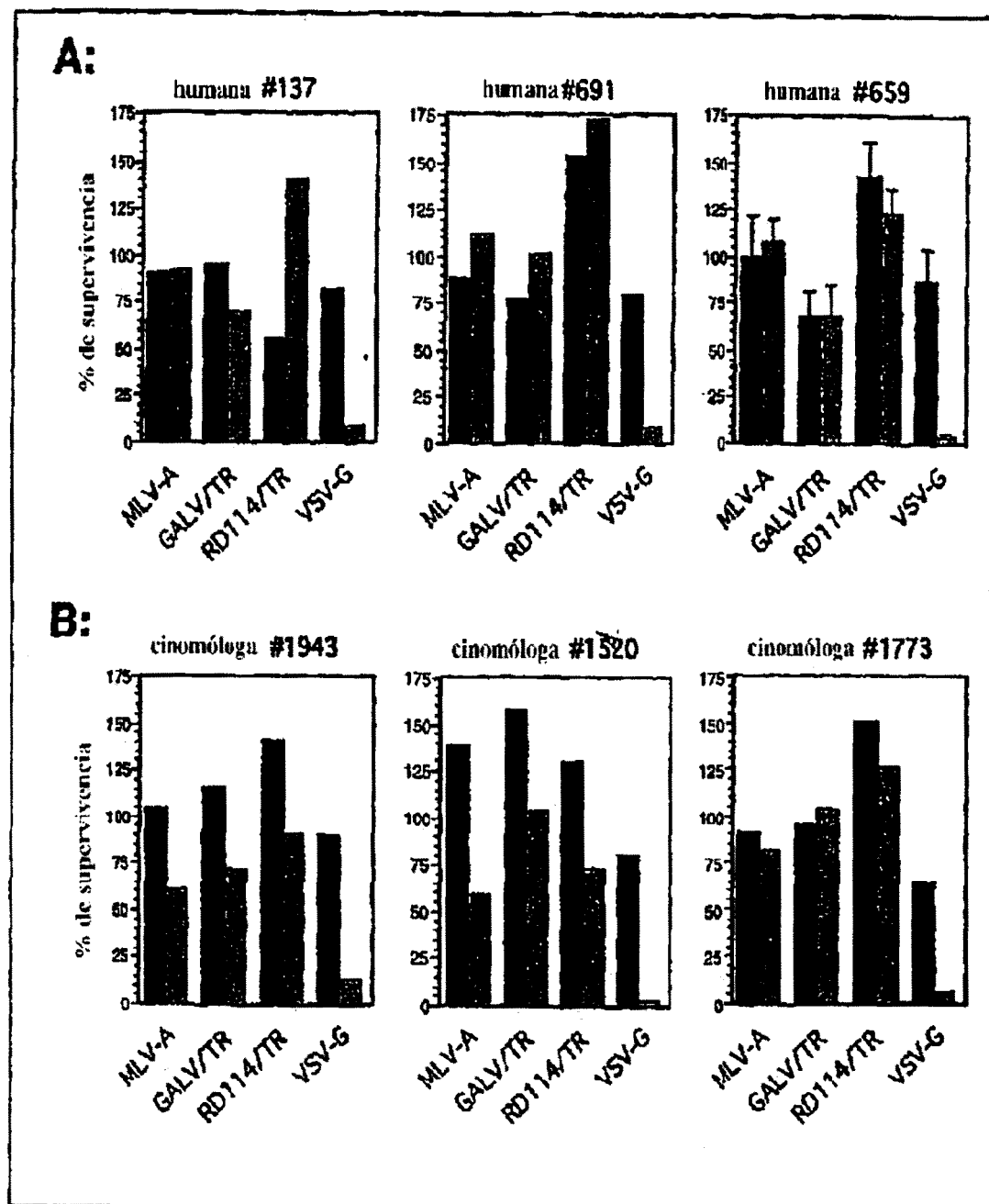


FIG.4

A: Células humanas CD34+

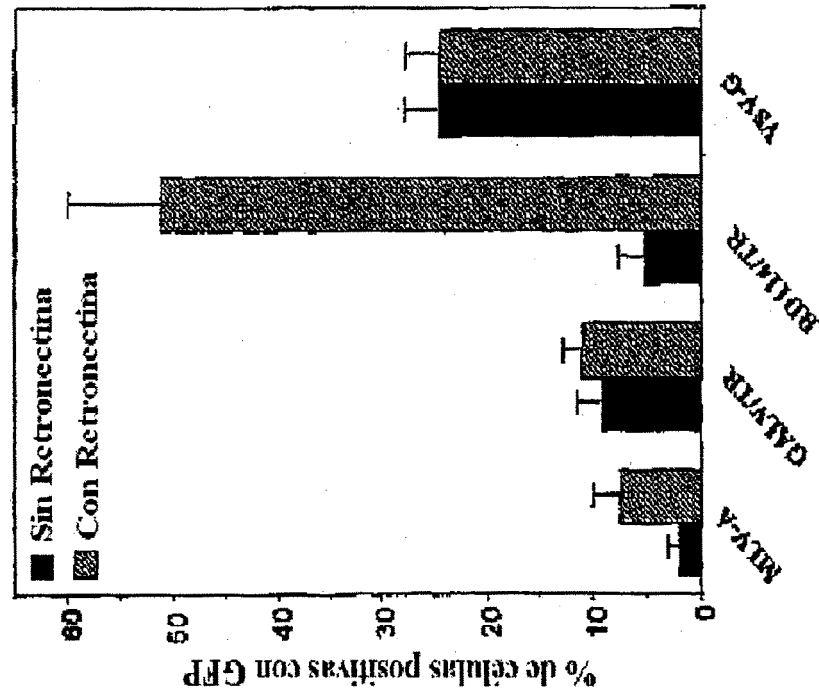
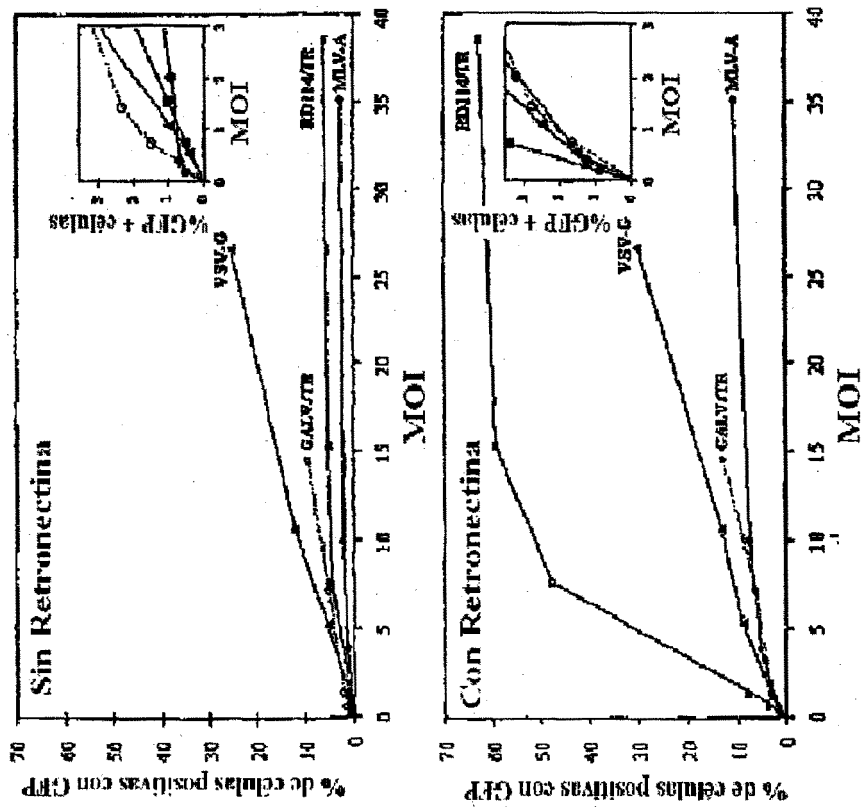


FIG.5 (debut)

B: Células cinomólogas CD34+

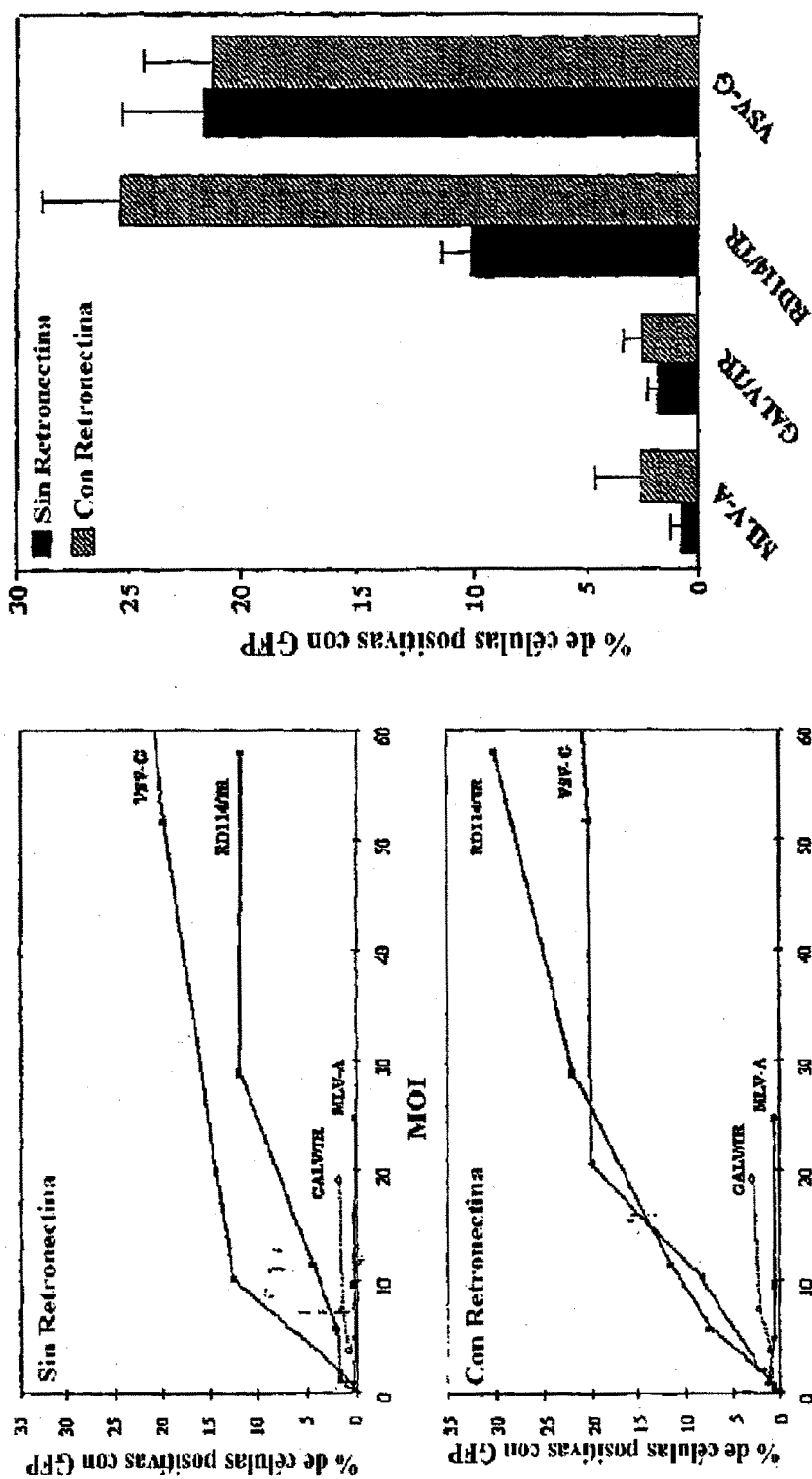


FIG.5 (fin)

A: PBL Humanas

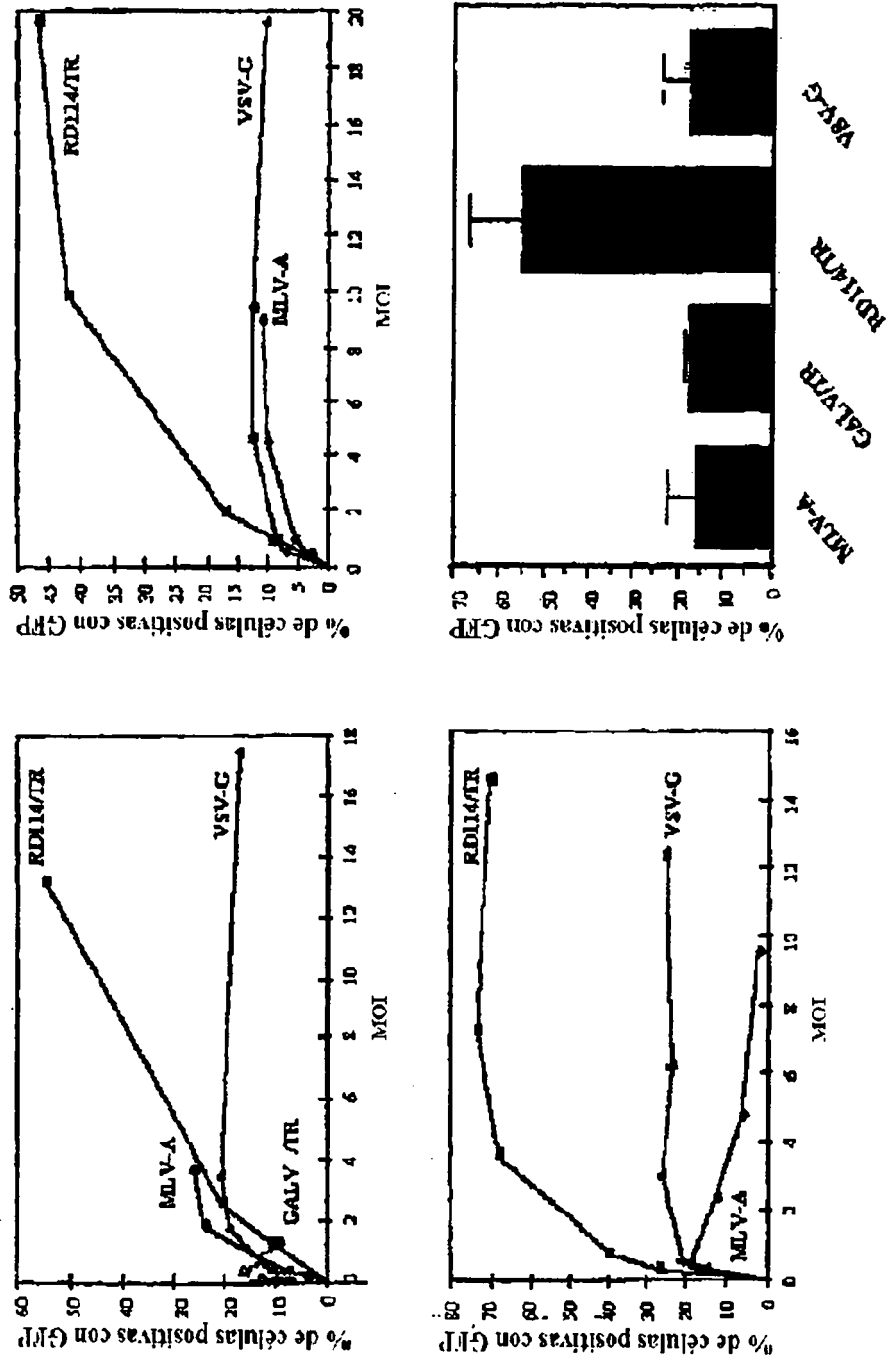


FIG.6 (debut)

B: PBL cinomólogas

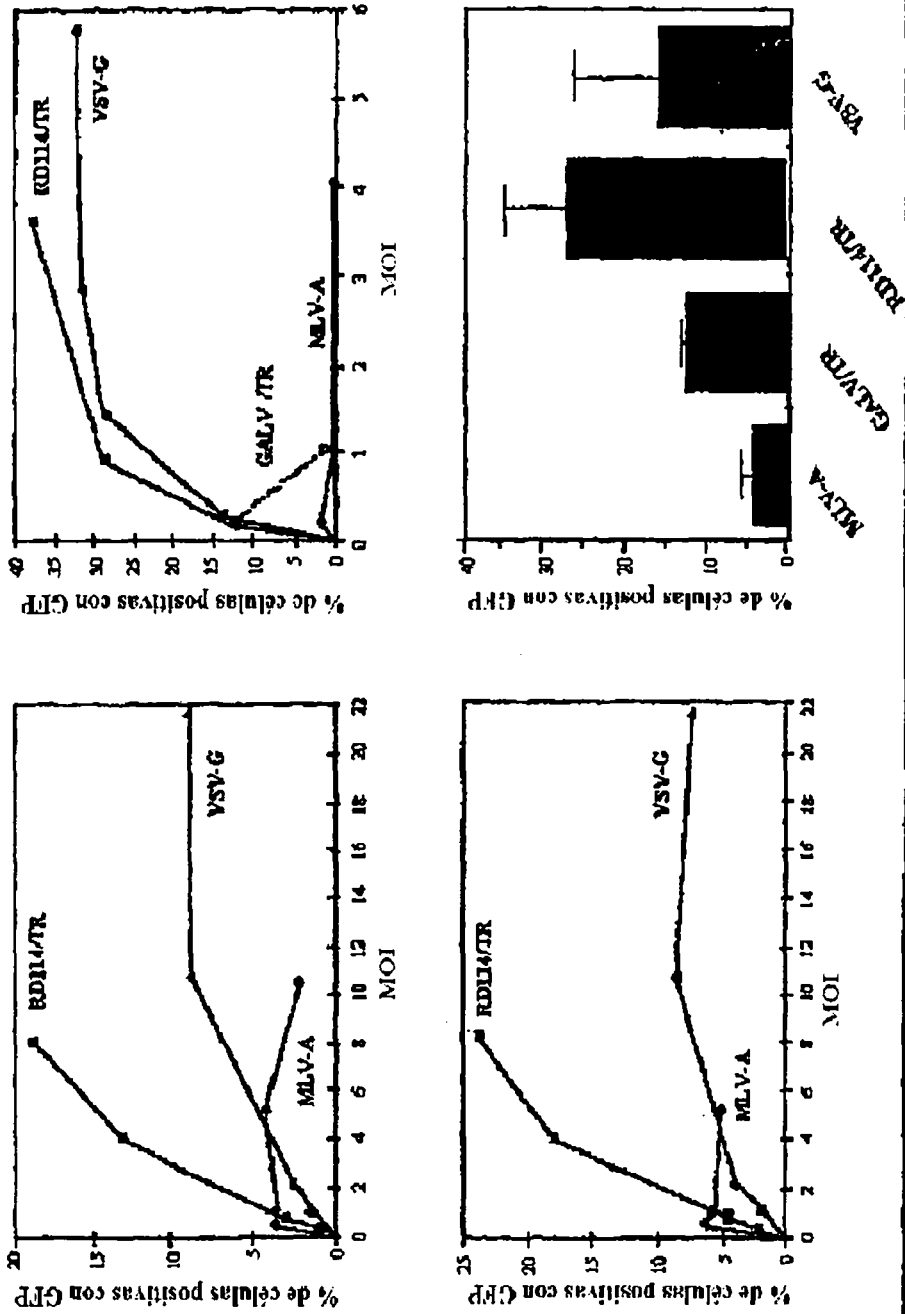


FIG.6 (fin)

[illegible][illegible]

FIG. 7

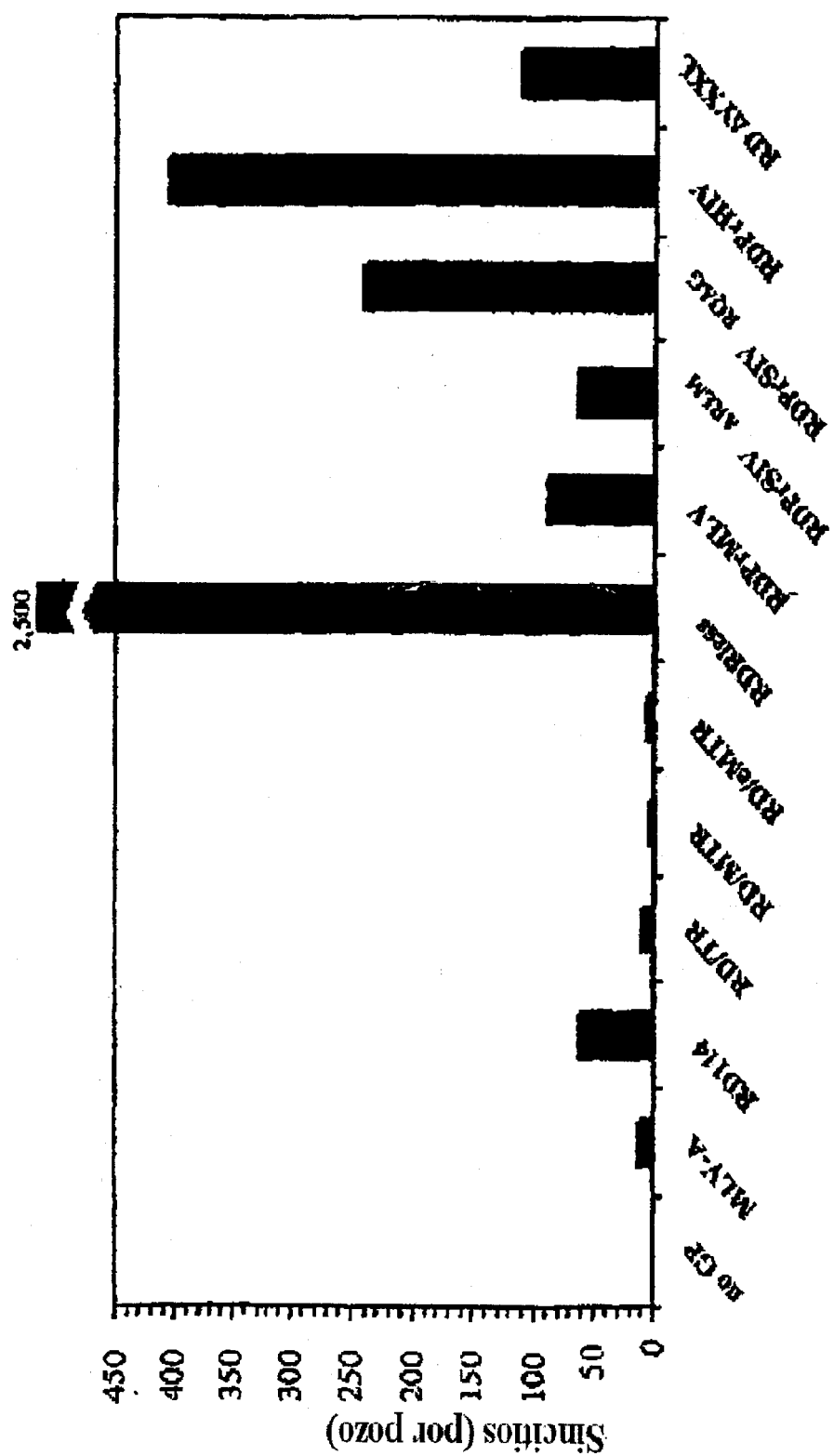
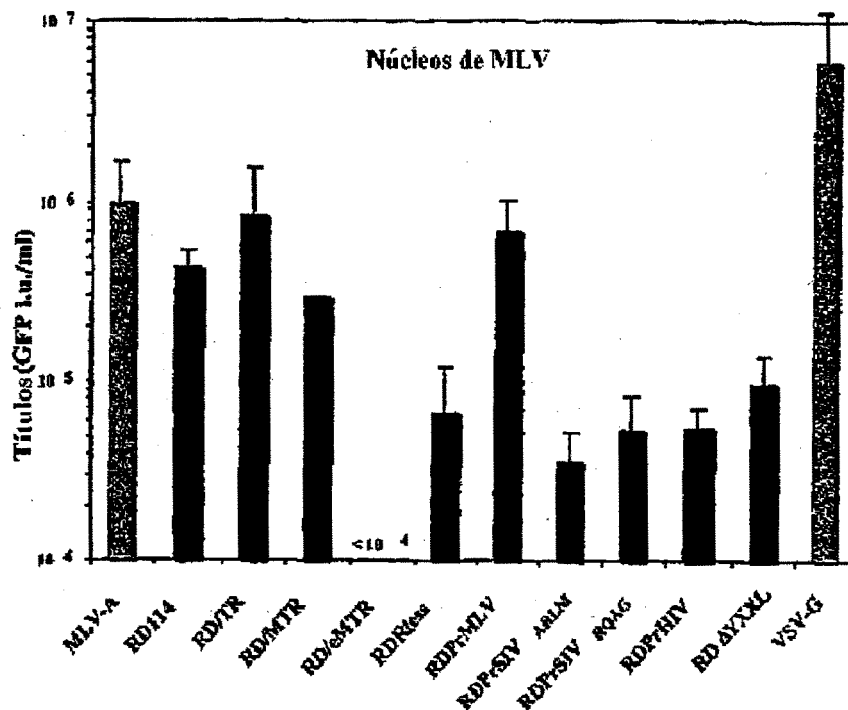


Fig. 8

A:



B:

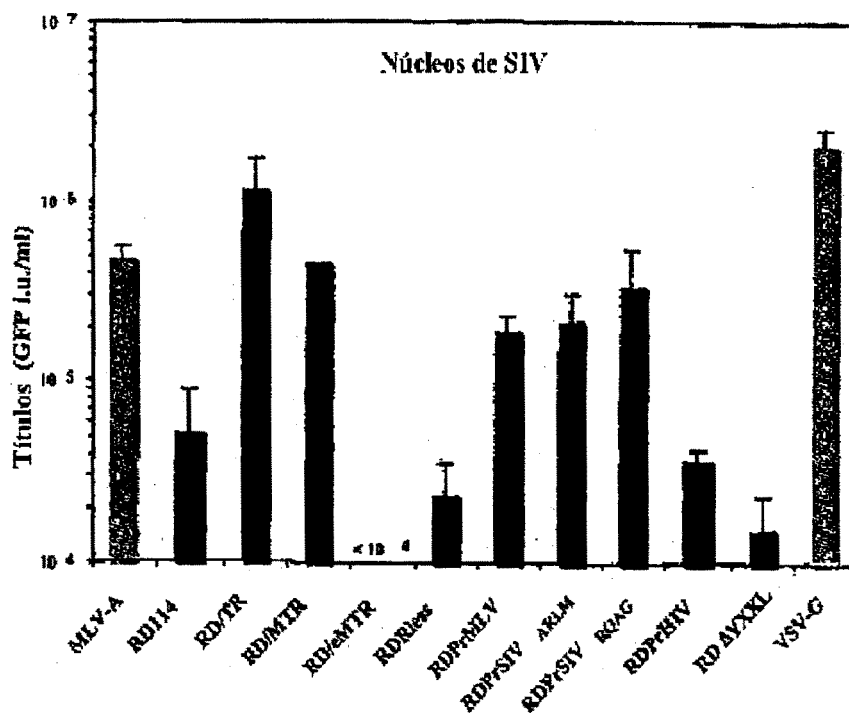


FIG.9

ES 2 326 217 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> TRONO DIDIER
 COSSET, Francois-Loic
 SANDRIN, Virginia
 BOSON, Bertrand
 NEGRE, Didier
 <120> GLICOPROTEÍNAS QUIMÉRICAS MEJORADAS Y VECTORES LENTIVIRALES PSEUDOTIPADOS
 <130> CLFR: 016WO
 <140> DESCONOCIDO
 <141> 2003-04-25
 <150> 60: 375.654
 <151> 2002-26-04
 <160> 4
 <170> PatentIn Ver. 2.1
 <210> 1
 <211> 1689
 <212> ADN
 <213> *Chimaera* sp.
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1689)
 <400> 1

35	atg aaa ctc cca aca gga atg gtc att tta tgt agc cta ata ata gtt	48
	Met Lys Leu Pro Thr Gly Met Val Ile Leu Cys Ser Leu Ile Ile Val	
	1 5 10 15	
40	cgg gca ggg ttt gac gac ccc cgc aag gct atc gca tta gta caa aaa	96
	Arg Ala Gly Phe Asp Asp Pro Arg Lys Ala Ile Ala Leu Val Gln Lys	
	20 25 30	
45	caa cat ggt aaa cca tgc gaa tgc agc gga ggg cag gta tcc gag gcc	144
	Gln His Gly Lys Pro Cys Glu Cys Ser Gly Gly Gln Val Ser Glu Ala	
	35 40 45	
50	cca ccg aac tcc atc caa cag gta act tgc cca ggc aag acg gcc tac	192
	Pro Pro Asn Ser Ile Gln Gln Val Thr Cys Pro Gly Lys Thr Ala Tyr	
	50 55 60	
55	tta atg acc aac caa aaa tgg aaa tgc aga gtc act cca aaa atc tca	240
	Leu Met Thr Asn Gln Lys Trp Lys Cys Arg Val Thr Pro Lys Ile Ser	
	65 70 75 80	
60	cct agc ggg gga gaa ctc cag aac tgc ccc tgt aac act ttc cag gac	288
	Pro Ser Gly Gly Glu Leu Gln Asn Cys Pro Cys Asn Thr Phe Gln Asp	
	85 90 95	
65	tcg atg cac agt tct tgt tat act gaa tac cgg caa tgc agg cga att	336
	Ser Met His Ser Ser Cys Tyr Thr Glu Tyr Arg Gln Cys Arg Arg Ile	
	100 105 110	
70	aat aag aca tac tac acg gcc acc ttg ctt aaa ata cgg tct ggg agc	384
	Asn Lys Thr Tyr Tyr Thr Ala Thr Leu Leu Lys Ile Arg Ser Gly Ser	

ES 2 326 217 T3

	115	120	125	
5	ctc aac gag gta cag ata tta caa aac ccc aat cag ctc cta cag tcc Leu Asn Glu Val Gln Ile Leu Gln Asn Pro Asn Gln Leu Leu Gln Ser 130 135 140	432		
10	cct tgt agg ggc tct ata aat cag ccc gtt tgc tgg agt gcc aca gcc Pro Cys Arg Gly Ser Ile Asn Gln Pro Val Cys Trp Ser Ala Thr Ala 145 150 155 160	480		
15	ccc atc cat atc tcc gat ggt gga gga ccc ctc gat act aag aga gtg Pro Ile His Ile Ser Asp Gly Gly Gly Pro Leu Asp Thr Lys Arg Val 165 170 175	528		
20	tgg aca gtc caa aaa agg cta gaa caa att cat aag gct atg act cct Trp Thr Val Gln Lys Arg Leu Glu Gln Ile His Lys Ala Met Thr Pro 180 185 190	576		
25	gaa ctt caa tac cac ccc tta gcc ctg ccc aaa gtc aga gat gac ctt Glu Leu Gln Tyr His Pro Leu Ala Leu Pro Lys Val Arg Asp Asp Leu 195 200 205	624		
30	agc ctt gat gca cgg act ttt gat atc ctg aat acc act ttt agg tta Ser Leu Asp Ala Arg Thr Phe Asp Ile Leu Asn Thr Thr Phe Arg Leu 210 215 220	672		
35	ctc cag atg tcc aat ttt agc ctt gcc caa gat tgt tgg ctc tgt tta Leu Gln Met Ser Asn Phe Ser Leu Ala Gln Asp Cys Trp Leu Cys Leu 225 230 235 240	720		
40	aaa cta ggt acc cct acc cct ctt gcg ata ccc act ccc tct tta acc Lys Leu Gly Thr Pro Thr Pro Leu Ala Ile Pro Thr Pro Ser Leu Thr 245 250 255	768		
45	tac tcc cta gca gac tcc cta gcg aat gcc tcc tgt cag att ata cct Tyr Ser Leu Ala Asp Ser Leu Ala Asn Ala Ser Cys Gln Ile Ile Pro 260 265 270	816		
50	ccc ctc ttg gtt caa ccg atg cag ttc tcc aac tcg tcc tgt tta tct Pro Leu Leu Val Gln Pro Met Gln Phe Ser Asn Ser Ser Cys Leu Ser 275 280 285	864		
55	tcc cct ttc att aac gat acg gaa caa ata gac tta ggt gca gtc acc Ser Pro Phe Ile Asn Asp Thr Glu Gln Ile Asp Leu Gly Ala Val Thr 290 295 300	912		
60	ttt act aac tgc acc tct gta gcc aat gtc agt agt cct tta tgt gcc Phe Thr Asn Cys Thr Ser Val Ala Asn Val Ser Ser Pro Leu Cys Ala 305 310 315 320	960		
65	cta aac ggg tca gtc ttc ctc tgt gga aat aac atg gca tac acc tat Leu Asn Gly Ser Val Phe Leu Cys Gly Asn Asn Met Ala Tyr Thr Tyr 325 330 335	1008		
	tta ccc caa aac tgg acc aga ctt tgc gtc caa gcc tcc ctc ctc ccc Leu Pro Gln Asn Trp Thr Arg Leu Cys Val Gln Ala Ser Leu Leu Pro 340 345 350	1056		
	gac att gac atc aac ccg ggg gat gag cca gtc ccc att cct gcc att Asp Ile Asp Ile Asn Pro Gly Asp Glu Pro Val Pro Ile Pro Ala Ile 355 360 365	1104		
	gat cat tat ata cat aga cct aaa cga gct gta cag ttc atc cct tta	1152		

ES 2 326 217 T3

	Asp	His	Tyr	Ile	His	Arg	Pro	Lys	Arg	Ala	Val	Gln	Phe	Ile	Pro	Leu	
	370						375					380					
5	cta	gct	gga	ctg	gga	atc	acc	gca	gca	ttc	acc	acc	gga	gct	aca	ggc	1200
	Leu	Ala	Gly	Leu	Gly	Ile	Thr	Ala	Ala	Phe	Thr	Thr	Gly	Ala	Thr	Gly	
	385					390					395					400	
10	cta	ggt	gtc	tcc	gtc	acc	cag	tat	aca	aaa	tta	tcc	cat	cag	tta	ata	1248
	Leu	Gly	Val	Ser	Val	Thr	Gln	Tyr	Thr	Lys	Leu	Ser	His	Gln	Leu	Ile	
					405					410					415		
15	tct	gat	gtc	caa	gtc	tta	tcc	ggt	acc	ata	caa	gat	tta	caa	gac	cag	1296
	Ser	Asp	Val	Gln	Val	Leu	Ser	Gly	Thr	Ile	Gln	Asp	Leu	Gln	Asp	Gln	
				420					425					430			
20	gta	gac	tcg	tta	gct	gaa	gta	ggt	ctc	caa	aat	agg	agg	gga	ctg	gac	1344
	Val	Asp	Ser	Leu	Ala	Glu	Val	Val	Leu	Gln	Asn	Arg	Arg	Gly	Leu	Asp	
			435					440					445				
25	cta	cta	acg	gca	gaa	caa	gga	gga	att	tgt	tta	gcc	tta	caa	gaa	aaa	1392
	Leu	Leu	Thr	Ala	Glu	Gln	Gly	Gly	Ile	Cys	Leu	Ala	Leu	Gln	Glu	Lys	
		450					455					460					
30	tgc	tgt	ttt	tat	gct	aac	aag	tca	gga	att	gtg	aga	aac	aaa	ata	aga	1440
	Cys	Cys	Phe	Tyr	Ala	Asn	Lys	Ser	Gly	Ile	Val	Arg	Asn	Lys	Ile	Arg	
	465					470					475					480	
35	acc	cta	caa	gaa	gaa	tta	caa	aaa	cgc	agg	gaa	agc	ctg	gca	acc	aac	1488
	Thr	Leu	Gln	Glu	Glu	Leu	Gln	Lys	Arg	Arg	Glu	Ser	Leu	Ala	Thr	Asn	
				485					490						495		
40	cct	ctc	tgg	acc	ggg	ctg	cag	ggc	ttt	ctt	ccg	tac	ctc	cta	cct	ctc	1536
	Pro	Leu	Trp	Thr	Gly	Leu	Gln	Gly	Phe	Leu	Pro	Tyr	Leu	Leu	Pro	Leu	
			500						505					510			
45	ctg	gga	ccc	cta	ctc	acc	ctc	cta	ctc	ata	cta	acc	att	ggg	cca	tgc	1584
	Leu	Gly	Pro	Leu	Leu	Thr	Leu	Leu	Leu	Ile	Leu	Thr	Ile	Gly	Pro	Cys	
			515					520					525				
50	gtt	ttc	aat	cga	tta	gtt	caa	ttt	gtt	aaa	gac	agg	atc	tca	gta	gtc	1632
	Val	Phe	Asn	Arg	Leu	Val	Gln	Phe	Val	Lys	Asp	Arg	Ile	Ser	Val	Val	
			530				535					540					
55	cag	gct	tta	gtc	ctg	act	caa	caa	tac	cac	cag	cta	aaa	cca	cta	gaa	1680
	Gln	Ala	Leu	Val	Leu	Thr	Gln	Gln	Tyr	His	Gln	Leu	Lys	Pro	Leu	Glu	
	545					550					555					560	
60	tac	gag	cca														1689
	Tyr	Glu	Pro														
65	<210>	2															
	<211>	563															
	<212>	PRT															
	<213>	Chimaera sp.															
70	<400>	2															
	Met	Lys	Leu	Pro	Thr	Gly	Met	Val	Ile	Leu	Cys	Ser	Leu	Ile	Ile	Val	
	1				5					10				15			
	Arg	Ala	Gly	Phe	Asp	Asp	Pro	Arg	Lys	Ala	Ile	Ala	Leu	Val	Gln	Lys	
				20					25					30			

ES 2 326 217 T3

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

ES 2 326 217 T3

Asp His Tyr Ile His Arg Pro Lys Arg Ala Val Gln Phe Ile Pro Leu
 370 375 380
 5 Leu Ala Gly Leu Gly Ile Thr Ala Ala Phe Thr Thr Gly Ala Thr Gly
 385 390 395 400
 Leu Gly Val Ser Val Thr Gln Tyr Thr Lys Leu Ser His Gln Leu Ile
 405 410 415
 10 Ser Asp Val Gln Val Leu Ser Gly Thr Ile Gln Asp Leu Gln Asp Gln
 420 425 430
 Val Asp Ser Leu Ala Glu Val Val Leu Gln Asn Arg Arg Gly Leu Asp
 435 440 445
 15 Leu Leu Thr Ala Glu Gln Gly Gly Ile Cys Leu Ala Leu Gln Glu Lys
 450 455 460
 20 Cys Cys Phe Tyr Ala Asn Lys Ser Gly Ile Val Arg Asn Lys Ile Arg
 465 470 475 480
 Thr Leu Gln Glu Glu Leu Gln Lys Arg Arg Glu Ser Leu Ala Thr Asn
 485 490 495
 25 Pro Leu Trp Thr Gly Leu Gln Gly Phe Leu Pro Tyr Leu Leu Pro Leu
 500 505 510
 30 Leu Gly Pro Leu Leu Thr Leu Leu Leu Ile Leu Thr Ile Gly Pro Cys
 515 520 525
 Val Phe Asn Arg Leu Val Gln Phe Val Lys Asp Arg Ile Ser Val Val
 530 535 540
 35 Gln Ala Leu Val Leu Thr Gln Gln Tyr His Gln Leu Lys Pro Leu Glu
 545 550 555 560
 Tyr Glu Pro
 40
 <210> 3
 <211> 2058
 <212> ADN
 45 <213> *Chimaera sp.*
 <220>
 <221> CDS
 50 <222> (1)..(2058)
 <400> 3
 atg gta ttg ctg cct ggg tcc atg ctt ctc acc tca aac ctg cac cac 48
 Met Val Leu Leu Pro Gly Ser Met Leu Leu Thr Ser Asn Leu His His
 55 1 5 10 15
 ctt cgg cac cag atg agt cct ggg agc tgg aaa aga ctg atc atc ctc 96
 Leu Arg His Gln Met Ser Pro Gly Ser Trp Lys Arg Leu Ile Ile Leu
 60 20 25 30
 tta agc tgc gta ttc ggc ggc ggc ggg acg agt ctg caa aat aag aac 144
 Leu Ser Cys Val Phe Gly Gly Gly Gly Thr Ser Leu Gln Asn Lys Asn
 35 40 45
 65

ES 2 326 217 T3

	ccc cac cag ccc atg acc ctc act tgg cag gta ctg tcc caa act gga	192
	Pro His Gln Pro Met Thr Leu Thr Trp Gln Val Leu Ser Gln Thr Gly	
	50 55 60	
5	gac gtt gtc tgg gat aca aag gca gtc cag ccc cct tgg act tgg tgg	240
	Asp Val Val Trp Asp Thr Lys Ala Val Gln Pro Pro Trp Thr Trp Trp	
	65 70 75 80	
10	ccc aca ctt aaa cct gat gta tgt gcc ttg gcg gct agt ctt gag tcc	288
	Pro Thr Leu Lys Pro Asp Val Cys Ala Leu Ala Ala Ser Leu Glu Ser	
	85 90 95	
15	tgg gat atc ccg gga acc gat gtc tcg tcc tct aaa cga gtc aga cct	336
	Trp Asp Ile Pro Gly Thr Asp Val Ser Ser Ser Lys Arg Val Arg Pro	
	100 105 110	
20	ccg gac tca gac tat act gcc gct tat aag caa atc acc tgg gga gcc	384
	Pro Asp Ser Asp Tyr Thr Ala Ala Tyr Lys Gln Ile Thr Trp Gly Ala	
	115 120 125	
25	ata ggg tgc agc tac cct cgg gct agg act aga atg gca agc tct acc	432
	Ile Gly Cys Ser Tyr Pro Arg Ala Arg Thr Arg Met Ala Ser Ser Thr	
	130 135 140	
30	ttc tac gta tgt ccc cgg gat ggc cgg acc ctt tca gaa gct aga agg	480
	Phe Tyr Val Cys Pro Arg Asp Gly Arg Thr Leu Ser Glu Ala Arg Arg	
	145 150 155 160	
35	tgc ggg ggg cta gaa tcc cta tac tgt aaa gaa tgg gat tgt gag acc	528
	Cys Gly Gly Leu Glu Ser Leu Tyr Cys Lys Glu Trp Asp Cys Glu Thr	
	165 170 175	
40	acg ggg acc ggt tat tgg cta tct aaa tcc tca aaa gac ctc ata act	576
	Thr Gly Thr Gly Tyr Trp Leu Ser Lys Ser Ser Lys Asp Leu Ile Thr	
	180 185 190	
45	gta aaa tgg gac caa aat agc gaa tgg act caa aaa ttt caa cag tgt	624
	Val Lys Trp Asp Gln Asn Ser Glu Trp Thr Gln Lys Phe Gln Gln Cys	
	195 200 205	
50	cac cag acc ggc tgg tgt aac ccc ctt aaa ata gat ttc aca gac aaa	672
	His Gln Thr Gly Trp Cys Asn Pro Leu Lys Ile Asp Phe Thr Asp Lys	
	210 215 220	
55	gga aaa tta tcc aag gac tgg ata acg gga aaa acc tgg gga tta aga	720
	Gly Lys Leu Ser Lys Asp Trp Ile Thr Gly Lys Thr Trp Gly Leu Arg	
	225 230 235 240	
60	ttc tat gtg tct gga cat cca ggc gta cag ttc acc att cgc tta aaa	768
	Phe Tyr Val Ser Gly His Pro Gly Val Gln Phe Thr Ile Arg Leu Lys	
	245 250 255	
65	atc acc aac atg cca gct gtg gca gta ggt cct gac ctc gtc ctt gtg	816
	Ile Thr Asn Met Pro Ala Val Ala Val Gly Pro Asp Leu Val Leu Val	
	260 265 270	
70	gaa caa gga cct cct aga acg tcc ctc gct ctc cca cct cct ctt ccc	864
	Glu Gln Gly Pro Pro Arg Thr Ser Leu Ala Leu Pro Pro Pro Leu Pro	
	275 280 285	
75	cca agg gaa gcg cca ccg cca tct ctc ccc gac tct aac tcc aca gcc	912
	Pro Arg Glu Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Asp Ser Asn Ser Thr Ala	
	290 295 300	

ES 2 326 217 T3

	ctg gcg act agt gca caa act ccc acg gtg aga aaa aca att gtt acc	960
	Leu Ala Thr Ser Ala Gln Thr Pro Thr Val Arg Lys Thr Ile Val Thr	
	305 310 315 320	
5	cta aac act ccg cct ccc acc aca ggc gac aga ctt ttt gat ctt gtg	1008
	Leu Asn Thr Pro Pro Pro Thr Thr Gly Asp Arg Leu Phe Asp Leu Val	
	325 330 335	
10	cag ggg gcc ttc cta acc tta aat gct acc aac cca ggg gcc act gag	1056
	Gln Gly Ala Phe Leu Thr Leu Asn Ala Thr Asn Pro Gly Ala Thr Glu	
	340 345 350	
15	tct tgc tgg ctt tgt ttg gcc atg ggc ccc cct tat tat gaa gca ata	1104
	Ser Cys Trp Leu Cys Leu Ala Met Gly Pro Pro Tyr Tyr Glu Ala Ile	
	355 360 365	
20	gcc tca tca gga gag gtc gcc tac tcc acc gac ctt gac cgg tgc cgc	1152
	Ala Ser Ser Gly Glu Val Ala Tyr Ser Thr Asp Leu Asp Arg Cys Arg	
	370 375 380	
25	tgg ggg acc caa gga aag ctc acc ctc act gag gtc tca gga cac ggg	1200
	Trp Gly Thr Gln Gly Lys Leu Thr Leu Thr Glu Val Ser Gly His Gly	
	385 390 395 400	
30	ttg tgc ata gga aag gtg ccc ttt acc cat cag cat ctc tgc aat cag	1248
	Leu Cys Ile Gly Lys Val Pro Phe Thr His Gln His Leu Cys Asn Gln	
	405 410 415	
35	acc cta tcc atc aat tcc tcc gga gac cat cag tat ctg ctc ccc tcc	1296
	Thr Leu Ser Ile Asn Ser Ser Gly Asp His Gln Tyr Leu Leu Pro Ser	
	420 425 430	
40	aac cat agc tgg tgg gct tgc agc act ggc ctc acc cct tgc ctc tcc	1344
	Asn His Ser Trp Trp Ala Cys Ser Thr Gly Leu Thr Pro Cys Leu Ser	
	435 440 445	
45	acc tca gtt ttt aat cag act aga gat ttc tgt atc cag gtc cag ctg	1392
	Thr Ser Val Phe Asn Gln Thr Arg Asp Phe Cys Ile Gln Val Gln Leu	
	450 455 460	
50	att cct cgc atc tat tac tat cct gaa gaa gtt ttg tta cag gcc tat	1440
	Ile Pro Arg Ile Tyr Tyr Tyr Pro Glu Glu Val Leu Leu Gln Ala Tyr	
	465 470 475 480	
55	gac aat tct cac ccc agg act aaa aga gag gct gtc tca ctt acc cta	1488
	Asp Asn Ser His Pro Arg Thr Lys Arg Glu Ala Val Ser Leu Thr Leu	
	485 490 495	
60	gct gtt tta ctg ggg ttg gga atc acg gcg gga ata ggt act ggt tca	1536
	Ala Val Leu Leu Gly Leu Gly Ile Thr Ala Gly Ile Gly Thr Gly Ser	
	500 505 510	
65	act gcc tta att aaa gga cct ata gac ctc cag caa ggc ctg aca agc	1584
	Thr Ala Leu Ile Lys Gly Pro Ile Asp Leu Gln Gln Gly Leu Thr Ser	
	515 520 525	
70	ctc cag atc gcc ata gat gct gac ctc cgg gcc ctc caa gac tca gtc	1632
	Leu Gln Ile Ala Ile Asp Ala Asp Leu Arg Ala Leu Gln Asp Ser Val	
	530 535 540	
75	agc aag tta gag gac tca ctg act tcc ctg tcc gag gta gtg ctc caa	1680
	Ser Lys Leu Glu Asp Ser Leu Thr Ser Leu Ser Glu Val Val Leu Gln	

ES 2 326 217 T3

	545	550	555	560	
5	aat agg aga ggc ctt gac ttg ctg ttt cta aaa gaa ggt ggc ctc tgt	Asn Arg Arg Gly Leu Asp Leu Leu Phe Leu Lys Glu Gly Gly Leu Cys	1728		
		565	570	575	
10	gcg gcc cta aag gaa gag tgc tgt ttt tac ata gac cac tca ggt gca	Ala Ala Leu Lys Glu Glu Cys Cys Phe Tyr Ile Asp His Ser Gly Ala	1776		
		580	585	590	
15	gta cgg gac tcc atg aaa aaa ctc aaa gaa aaa ctg gat aaa aga cag	Val Arg Asp Ser Met Lys Lys Leu Lys Glu Lys Leu Asp Lys Arg Gln	1824		
		595	600	605	
20	tta gag cgc cag aaa agc caa aac tgg tat gaa gga tgg ttc aat aac	Leu Glu Arg Gln Lys Ser Gln Asn Trp Tyr Glu Gly Trp Phe Asn Asn	1872		
		610	615	620	
25	tcc cct tgg ttc act acc ctg cta tca acc atc gct ggg ccc cta tta	Ser Pro Trp Phe Thr Thr Leu Leu Ser Thr Ile Ala Gly Pro Leu Leu	1920		
		625	630	635	640
30	ctc ctc ctt ctg ttg ctc atc ctc ggg cca tgc atc atc aat cga tta	Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ile Leu Gly Pro Cys Ile Ile Asn Arg Leu	1968		
		645	650	655	
35	gtt caa ttt gtt aaa gac agg atc tca gta gtc cag gct tta gtc ctg	Val Gln Phe Val Lys Asp Arg Ile Ser Val Val Gln Ala Leu Val Leu	2016		
		660	665	670	
40	act caa caa tac cac cag cta aag cct ata gag tac gag cca	Thr Gln Gln Tyr His Gln Leu Lys Pro Ile Glu Tyr Glu Pro	2058		
		675	680	685	
45	<210> 4				
	<211> 686				
	<212> PRT				
	<213> <i>Chimaera sp.</i>				
50	<400> 4				
55	Met Val Leu Leu Pro Gly Ser Met Leu Leu Thr Ser Asn Leu His His	1	5	10	15
60	Leu Arg His Gln Met Ser Pro Gly Ser Trp Lys Arg Leu Ile Ile Leu	20	25	30	
65	Leu Ser Cys Val Phe Gly Gly Gly Gly Thr Ser Leu Gln Asn Lys Asn	35	40	45	
70	Pro His Gln Pro Met Thr Leu Thr Trp Gln Val Leu Ser Gln Thr Gly	50	55	60	
75	Asp Val Val Trp Asp Thr Lys Ala Val Gln Pro Pro Trp Thr Trp Trp	65	70	75	80
80	Pro Thr Leu Lys Pro Asp Val Cys Ala Leu Ala Ala Ser Leu Glu Ser	85	90	95	
85	Trp Asp Ile Pro Gly Thr Asp Val Ser Ser Ser Lys Arg Val Arg Pro	100	105	110	
90	Pro Asp Ser Asp Tyr Thr Ala Ala Tyr Lys Gln Ile Thr Trp Gly Ala				

ES 2 326 217 T3

	115		120		125
5	Ile Gly Cys Ser Tyr Pro Arg Ala Arg Thr Arg Met Ala Ser Ser Thr				
	130		135		140
	Phe Tyr Val Cys Pro Arg Asp Gly Arg Thr Leu Ser Glu Ala Arg Arg				
	145		150		155 160
10	Cys Gly Gly Leu Glu Ser Leu Tyr Cys Lys Glu Trp Asp Cys Glu Thr				
		165		170	175
	Thr Gly Thr Gly Tyr Trp Leu Ser Lys Ser Ser Lys Asp Leu Ile Thr				
		180		185	190
15	Val Lys Trp Asp Gln Asn Ser Glu Trp Thr Gln Lys Phe Gln Gln Cys				
		195		200	205
	His Gln Thr Gly Trp Cys Asn Pro Leu Lys Ile Asp Phe Thr Asp Lys				
20		210		215	220
	Gly Lys Leu Ser Lys Asp Trp Ile Thr Gly Lys Thr Trp Gly Leu Arg				
			230		235 240
25	Phe Tyr Val Ser Gly His Pro Gly Val Gln Phe Thr Ile Arg Leu Lys				
		245		250	255
	Ile Thr Asn Met Pro Ala Val Ala Val Gly Pro Asp Leu Val Leu Val				
		260		265	270
30	Glu Gln Gly Pro Pro Arg Thr Ser Leu Ala Leu Pro Pro Pro Leu Pro				
		275		280	285
35	Pro Arg Glu Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Asp Ser Asn Ser Thr Ala				
		290		295	300
	Leu Ala Thr Ser Ala Gln Thr Pro Thr Val Arg Lys Thr Ile Val Thr				
			310		315 320
40	Leu Asn Thr Pro Pro Pro Thr Thr Gly Asp Arg Leu Phe Asp Leu Val				
		325		330	335
	Gln Gly Ala Phe Leu Thr Leu Asn Ala Thr Asn Pro Gly Ala Thr Glu				
45		340		345	350
	Ser Cys Trp Leu Cys Leu Ala Met Gly Pro Pro Tyr Tyr Glu Ala Ile				
		355		360	365
50	Ala Ser Ser Gly Glu Val Ala Tyr Ser Thr Asp Leu Asp Arg Cys Arg				
		370		375	380
	Trp Gly Thr Gln Gly Lys Leu Thr Leu Thr Glu Val Ser Gly His Gly				
			390		395 400
55	Leu Cys Ile Gly Lys Val Pro Phe Thr His Gln His Leu Cys Asn Gln				
		405		410	415
	Thr Leu Ser Ile Asn Ser Ser Gly Asp His Gln Tyr Leu Leu Pro Ser				
60		420		425	430
	Asn His Ser Trp Trp Ala Cys Ser Thr Gly Leu Thr Pro Cys Leu Ser				
		435		440	445
65	Thr Ser Val Phe Asn Gln Thr Arg Asp Phe Cys Ile Gln Val Gln Leu				

ES 2 326 217 T3

	450		455		460												
5	Ile	Pro	Arg	Ile	Tyr	Tyr	Tyr	Pro	Glu	Glu	Val	Leu	Leu	Gln	Ala	Tyr	
	465					470					475					480	
	Asp	Asn	Ser	His	Pro	Arg	Thr	Lys	Arg	Glu	Ala	Val	Ser	Leu	Thr	Leu	
				485						490					495		
10	Ala	Val	Leu	Leu	Gly	Leu	Gly	Ile	Thr	Ala	Gly	Ile	Gly	Thr	Gly	Ser	
				500				505						510			
	Thr	Ala	Leu	Ile	Lys	Gly	Pro	Ile	Asp	Leu	Gln	Gln	Gly	Leu	Thr	Ser	
15			515				520						525				
	Leu	Gln	Ile	Ala	Ile	Asp	Ala	Asp	Leu	Arg	Ala	Leu	Gln	Asp	Ser	Val	
	530					535						540					
20	Ser	Lys	Leu	Glu	Asp	Ser	Leu	Thr	Ser	Leu	Ser	Glu	Val	Val	Leu	Gln	
	545				550						555					560	
	Asn	Arg	Arg	Gly	Leu	Asp	Leu	Leu	Phe	Leu	Lys	Glu	Gly	Gly	Leu	Cys	
				565					570						575		
25	Ala	Ala	Leu	Lys	Glu	Glu	Cys	Cys	Phe	Tyr	Ile	Asp	His	Ser	Gly	Ala	
			580						585					590			
	Val	Arg	Asp	Ser	Met	Lys	Lys	Leu	Lys	Glu	Lys	Leu	Asp	Lys	Arg	Gln	
30			595					600					605				
	Leu	Glu	Arg	Gln	Lys	Ser	Gln	Asn	Trp	Tyr	Glu	Gly	Trp	Phe	Asn	Asn	
	610						615					620					
35	Ser	Pro	Trp	Phe	Thr	Thr	Leu	Leu	Ser	Thr	Ile	Ala	Gly	Pro	Leu	Leu	
	625					630					635					640	
	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Ile	Leu	Gly	Pro	Cys	Ile	Ile	Asn	Arg	Leu	
40					645				650						655		
	Val	Gln	Phe	Val	Lys	Asp	Arg	Ile	Ser	Val	Val	Gln	Ala	Leu	Val	Leu	
			660					665						670			
45	Thr	Gln	Gln	Tyr	His	Gln	Leu	Lys	Pro	Ile	Glu	Tyr	Glu	Pro			
		675						680					685				