



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 276 407**

51 Int. Cl.:
C12N 15/86 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **96927085 .9**
86 Fecha de presentación : **25.07.1996**
87 Número de publicación de la solicitud: **0843732**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **27.05.1998**

54 Título: **Secuencia de retroelementos naturales o sintéticos que tienen como función permitir la inserción de secuencias nucleotídicas en una célula eucariota.**

30 Prioridad: **07.08.1995 FR 95 09587**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.06.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.06.2007

73 Titular/es: **INSTITUT PASTEUR**
25-28, rue du Docteur Roux
75724 Paris Cédex 15, FR

72 Inventor/es: **Choulika, André y**
Nicolas, Jean-François

74 Agente: **Ruo, Alessandro**

ES 2 276 407 T3

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

DESCRIPCIÓN

Secuencia de retroelementos naturales o sintéticos que tienen como función permitir la inserción de secuencias nucleotídicas en una célula eucariota.

5 La presente invención se refiere a una secuencia de retroelementos naturales o sintéticos, en particular una secuencia de nucleótidos retroviral LTR, más en particular de ADN retroviral, así como a un vector retroviral que contiene esta secuencia y que permite, durante la infección de una célula a la que se desea integrar un gen de interés contenido en este vector, la eliminación de una gran parte de las secuencias provirales que ya no son necesarias después de la
10 integración del provirus recombinante.

La presente invención se refiere a un polinucleótido que comprende:

(a) la secuencia LTR3' o LTR5' de un retroelemento natural o sintético; y

15 (b) una secuencia de inserción que comprende una secuencia de nucleótidos de interés así como, para un sistema de recombinación dado, una única secuencia de reconocimiento de una recombinasa,

estando insertada dicha secuencia de inserción en dicha LTR3' o dicha LTR5', de manera que permita la inserción,
20 por intervención de un vector retroviral, de dicha secuencia de interés en el genoma de una célula hospedadora, sin que se inserten secuencias provirales que ya no son necesarias después de la integración de la secuencia de interés en el genoma de la célula hospedadora.

Los recientes avances en el uso de retrovirus como vectores de genes entran en tres categorías: (i) mejora de
25 las líneas celulares de encapsidación, (ii) manipulación del tropismo de las proteínas de la envoltura, (iii) expresión de genes múltiples. La modificación de la estructura del provirus integrado todavía no se ha aprovechado mucho porque esta última contiene ciertos elementos esenciales que se tratan en cis. Estos elementos son fuente de múltiples problemas.

30 Desde el punto de vista de la estructura, el sistema de vector retroviral se construye sobre dos elementos: los genes de transcomplementación (*gag*, *pol* y *env*), y las secuencias que se tratan en cis (U3, R, U5, la pista polipurina (PPT), el sitio de enlace del cebo (PBS) y la señal de encapsidación y de dimerización).

Los genes de transcomplementación se incorporan en células de transcomplementación. No se transfieren hacia las
35 células diana.

Las secuencias que se tratan en cis se incorporan en vectores retrovirales. En su mayoría se transfieren hacia las
células diana infectadas y se integran en el provirus recombinante. La eliminación de cualquiera de estas secuencias que se tratan en cis desemboca en un sistema retroviral no funcional. La señal de encapsidación es necesaria para la
40 encapsidación del genoma retroviral en partículas virales. Se requieren PBS, PPT y R para la transcripción inversa. Las secuencias U3 y U5 son indispensables para la transcripción inversa y para la integración del producto retroviral introducido en la célula.

Una vez integrado el provirus, estas secuencias ya no son necesarias para la expresión del gen. Al contrario, estas
45 secuencias pueden incluso ser causa de numerosos problemas. (i) Una interferencia transcripcional puede ser resultado de la presencia del promotor fuerte en las secuencias U3. (ii) El PBS puede actuar como un elemento inhibidor en cis para los promotores internos. Por ejemplo, en las células pluripotentes, el PBS es una secuencia de reconocimiento para un represor fuerte y además actúa como un elemento inhibidor (iii) La secuencia U3 contiene al menos uno de los elementos de regulación negativa situados en los activadores a distancia repetidos directos entre -345 y -306. (iv)
50 La LTR3' (*long terminal repeat*) puede activar genes que flanquean células con consecuencias a veces perjudiciales para la célula. (v) El ARN expresado a partir del promotor de la LTR5' contiene la señal de encapsidación, y puede, en consecuencia, recuperarse en una partícula retroviral. Este ARN puede recombinarse con un ARN celular o el ARN retroviral de un fenotipo, desembocando en la recuperación de un retrovirus dotado de nuevas propiedades (creando un peligro biológico potencial). Estos problemas todavía no se han superado por completo, ya que todos estos elementos
55 son necesarios para la replicación y la inserción del virus en el genoma.

En el contexto de la presente invención, los autores de la invención han desarrollado una secuencia de retroelementos naturales o sintéticos, principalmente una secuencia de nucleótidos retroviral, y en particular un vector retroviral que comprende esta secuencia, concebida de manera que permita la eliminación de una gran parte de las secuencias
60 provirales que ya no son necesarias después de la integración de un provirus en una célula hospedadora. Más en particular, esta secuencia retroviral es un ADN retroviral que puede permitir la integración de una sola secuencia LTR, de un retrotransposón, o una secuencia que comprende una región U3, R o U5 en el genoma de una célula hospedadora.

La invención se refiere asimismo a las células hospedadoras, preferentemente células eucariotas, obtenidas después
65 de transfección por la secuencia de retroelementos de la invención o un vector que la contiene.

La presente invención se refiere así a un polinucleótido que comprende:

(a) la secuencia LTR3' o LTR5' de un retroelemento natural o sintético; y

(b) una secuencia de inserción que comprende una secuencia de nucleótidos de interés así como, para un sistema de recombinación dado, una única secuencia de reconocimiento de una recombinasa,

estando insertada dicha secuencia de inserción en dicha LTR3' o dicha LTR5', de manera que permita la inserción, por intervención de un vector retroviral, de dicha secuencia de interés en el genoma de una célula hospedadora, sin que se inserten secuencias provirales que ya no son necesarias después de la integración de la secuencia de interés en el genoma de la célula hospedadora.

En particular, esta secuencia de inserción se incorpora en una región que se trata en cis, más en particular, en la región LTR3' o LTR5' y preferentemente en la región U3 del LTR3' o U5 del LTR5' de esta secuencia retroviral. Esta secuencia de inserción comprende una secuencia de nucleótidos de interés que puede integrarse en el genoma de una célula hospedadora, así como una secuencia de reconocimiento para una recombinasa. Preferentemente, el conjunto de la secuencia retroviral no contiene más que una sola secuencia de reconocimiento situada con la secuencia de interés, por delante o por detrás, por ejemplo, aunque este último parámetro no sea absolutamente necesario. La secuencia de nucleótidos de interés puede estar situada por detrás de la secuencia de reconocimiento en la medida en que esta última esté comprendida en la región transferida en una célula diana durante la infección de esta célula diana por un retrovirus que contiene la secuencia retroviral. La longitud máxima de la secuencia de inserción que contiene el vector retroviral de la invención se sitúa normalmente entre 0,5 y 10 kb.

De forma particular, la secuencia de la invención comprende asimismo una secuencia de ADN que codifica para una recombinasa susceptible de reconocer la secuencia de su sitio de reconocimiento, estando esta secuencia de ADN que codifica para una recombinasa situada ventajosamente entre las regiones LTR5' y LTR3' del vector. La invención se refiere asimismo a un vector retroviral o retrovirus recombinante que comprende la secuencia descrita anteriormente. Preferentemente, el vector retroviral, que puede presentarse en forma de retrovirus recombinante, no contiene más que una sola secuencia de reconocimiento incorporada en la región que puede ser transferida a una célula diana.

El ADN de la invención permite así la inserción, por intervención de un vector retroviral, de secuencias de nucleótidos de interés en células hospedadoras, por ejemplo de tipo eucariota, sin que se inserten secuencias provirales que ya no son necesarias después de la integración de las secuencias de interés en el provirus.

El término "secuencia de nucleótidos de interés" usado anteriormente hace referencia a secuencias que se insertarán en el genoma de células hospedadoras para permitir así que éstas produzcan moléculas de interés, más en particular en terapia o para vacunación. Estas secuencias de interés incluyen, entre otros genes, secuencias de ADN o de ARN que codifican bien para proteínas (hormonas, inmunoglobulinas, enzimas u otros) cuando se usan los vectores retrovirales de la invención en terapia génica, o bien proteínas humanas o no humanas (como proteínas virales) cuando se trata de usar vectores retrovirales de la invención en el marco de protocolos de vacunación. Las secuencias nucleotídicas de interés pueden estar también constituidas en parte por elementos de regulación (es decir, promotor, activador) homólogos o heterólogos a la célula hospedadora, por una parte, y, por otra parte, por secuencias que codifican para la totalidad o parte de uno o varios genes o ADN complementario. Además, las secuencias de nucleótidos de interés pueden codificar también un ARN antisentido o una secuencia ribozima.

Las aplicaciones posibles de la secuencia de retroelementos de la presente invención son múltiples. La secuencia de la invención se usa bien simplemente para la inserción de secuencias de nucleótidos en células hospedadoras como células eucariotas en un entorno que favorece una mejor expresión de este gen, bien en terapia génica o bien en vacunación. A modo de ejemplo, puede usarse la secuencia de interés descrita en *Nature Medicine*, Volumen nº 7, julio de 1995, correspondiente al inserto de plásmidos pMEPV_H/pMEPV_L o pMEPV_H/pREPV_K y el producto de expresión *in vivo* puede ser un elemento de una composición terapéutica.

El vector retroviral de la invención se obtiene por la transfección de una línea celular viral de transcomplementación con una secuencia de retroelementos de la invención que se presentan preferentemente en forma de plásmido y que comprende preferentemente en una de sus LTR y más en particular en su LTR de derecha una secuencia de nucleótidos de interés, así como una secuencia de reconocimiento. El plásmido puede contener asimismo una secuencia de nucleótidos que codifica para una recombinasa susceptible de reconocer el sitio de reconocimiento situada por delante o por detrás de la secuencia de interés, estando esta secuencia de nucleótidos situada ventajosamente entre las regiones LTR3' y LTR5'. Una vez efectuada la transfección de la línea celular viral, se obtiene un vector retroviral que puede usarse para la infección de una célula hospedadora en la que se desea integrar la secuencia de nucleótidos de interés.

El plásmido definido anteriormente, así como el procedimiento de transfección de la línea celular por dicho plásmido, entran asimismo en el marco de la presente invención.

La invención se refiere asimismo a un método o procedimiento de introducción de secuencias de nucleótidos de interés en una célula hospedadora como una célula eucariota. El procedimiento se caracteriza porque comprende una etapa de infección de una célula eucariota por un vector retroviral que contiene la secuencia retroviral de la invención que comprende la secuencia de nucleótidos que se va a introducir en la célula eucariota, en condiciones que permiten la integración en el genoma celular de la célula de una sola LTR del vector retroviral que contiene la secuencia que

ES 2 276 407 T3

se va a introducir en el genoma de la célula hospedadora y una segunda etapa de expresión de la secuencia de interés según los elementos del producto de ésta a partir de la célula recombinada.

5 La invención se refiere asimismo a un hospedador celular que tiene integrada en su genoma una estructura proviral que comprende una sola región LTR de un vector retroviral que contiene la secuencia retroviral de la invención, comportando esta secuencia LTR una copia única de una secuencia de nucleótidos de interés. Más en particular, el hospedador celular de la invención es una célula eucariota y la estructura proviral se caracteriza porque está libre esencialmente de secuencia PBS, de señal de encapsidación y de dimerización y/o de PPT.

10 La invención se refiere asimismo al uso de la secuencia de retroelementos o del vector retroviral de la invención para la fabricación de una composición que permite la producción en células hospedadoras de proteínas codificadas por una secuencia de nucleótidos de interés comprendida en este ADN retroviral. La invención se refiere asimismo al polinucleótido o el vector retroviral de la invención para su uso en el tratamiento médico de un paciente con vistas a integrar una secuencia de nucleótidos de interés en el genoma de células objeto.

15 Más en particular, la secuencia de la invención permite asimismo la transferencia de secuencias de nucleótidos o que codifican para anticuerpos en células hospedadoras. Se habla entonces de inmunización extracelular, ya que los anticuerpos generados a partir de estas secuencias producen su efecto en el interior de las células que los tienen integrados. Entre las secuencias de nucleótidos que codifican para anticuerpos que pueden estar integrados en células hospedadoras que usan la secuencia retroviral y el vector retroviral de la invención, se pueden mencionar, a modo de ejemplo no limitativo, los anticuerpos que reconocen proteínas de envoltura de virus VIH, en particular las proteínas gp.120 del virus VIH-1 y del virus VIH-2, así como anticuerpos que permiten bloquear la transcriptasa inversa. Estos anticuerpos se describen, entre otros, en la publicación de Maciejewski y col. (*Nature Medicine*, Volumen nº 7, julio de 1995). Al permitir el vector retroviral de la invención una integración más eficaz de estas secuencias de nucleótidos de interés, la eficacia terapéutica de este enfoque se mejora en consecuencia.

La invención se refiere asimismo a un método o procedimiento de expresión de una molécula codificada por una secuencia de nucleótidos de interés en una célula hospedadora en cultivo. El procedimiento comprende:

30 - la infección de la célula hospedadora por un vector retroviral de la invención que comprende la secuencia de nucleótidos de interés;

- el crecimiento de la célula hospedadora en condiciones que permiten la expresión de la secuencia de nucleótidos de interés; y

35 - la obtención de la molécula deseada.

La secuencia de nucleótidos retroviral así como los vectores retrovirales de la invención pueden usarse de varias formas para permitir la integración de la secuencia de nucleótidos de interés deseada. De hecho, los autores de la invención han demostrado que no era necesario asociar la expresión de la recombinasa directamente al vector retroviral, aunque los rendimientos de integración sean superiores cuando una secuencia nucleotídica que codifica para la recombinasa es parte integrante del vector.

45 Se introduce por infección en el genoma de una célula hospedadora un vector retroviral que comprende en la región LTR3' o LTR5' del vector retroviral una primera secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos de interés así como una secuencia de reconocimiento situada por detrás o por delante de la secuencia de interés, así como una segunda secuencia de nucleótidos idéntica a la primera secuencia de nucleótidos insertada en la región LTR5' del vector. Asimismo, se introduce en la célula por transfección un plásmido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para una recombinasa susceptible de reconocer la secuencia de reconocimiento. La expresión de la recombinasa por transfección transforma la estructura de un provirus de dos LTR en un provirus de una sola LTR. En este tipo de reacción, aproximadamente el 50% de los transformantes estables contienen el provirus modificado. Este resultado parcial puede explicarse por la expresión efímera del plásmido que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para la recombinasa después de la transfección, desembocando en una recombinación sin integración.

55 Se usa una secuencia retroviral que comprende una secuencia nucleotídica que comprende una secuencia de interés, así como una secuencia de reconocimiento situada por detrás o por delante de esta secuencia de interés. La secuencia completa se inserta en la región LTR3' de un retrovirus. El vector retroviral así obtenido se usa a continuación para infectar una línea celular que expresa constitutivamente o por inducción una recombinasa susceptible de reconocer la secuencia de reconocimiento. La eficacia de este sistema es elevada, sobre todo cuando el gen que codifica para la recombinasa se expresa desde el inicio de la infección retroviral.

65 Un vector retroviral comprende una secuencia de nucleótidos insertada en su región LTR3'. Esta secuencia de nucleótidos comprende una secuencia de interés, así como una secuencia de reconocimiento que puede ser reconocida por una recombinasa. La secuencia de reconocimiento se sitúa por detrás o por delante de la secuencia de interés. Además, en el vector retroviral, entre las dos LTR de este vector, se integran un gen que codifica para una recombinasa así como un promotor. A continuación se infecta una línea celular por este retrovirus. Dicho vector retroviral sólo genera provirus de una sola LTR. La eficacia de este sistema es elevada, ya que todos los sucesos integrados y

ES 2 276 407 T3

analizados tienen esta estructura. La principal ventaja de este vector retroviral es que asocia sucesos de recombinación conseguidos entre las dos LTR con la delección del gen que codifica para la recombinasa. En consecuencia, las células infectadas sólo expresan la recombinasa efímeramente.

5 Los autores de la invención han usado el sistema de recombinasa Crelox específico del sitio del bacteriófago P1. El sitio de reconocimiento LoxP se ha insertado en la LTR3' por delante de la secuencia de nucleótidos de interés en un vector de tipo Δ Enh, y el gen que codifica para la recombinasa cre entre las dos LTR. En la línea celular productora, la proteína Cre se expresa a partir de la construcción plasmídica proviral. Por otra parte, dado que el plásmido contiene una sola diana *loxP*, no se recombina por la proteína Cre. Después de la infección, el sitio *loxP* está duplicado por la LTR3' en la LTR5'. Así, Cre recombina los dos sitios *loxP* repetidos directos, lo que se traduce en la delección de todas las secuencias comprendidas entre los dos *loxP*, comprendidos el PBS, la señal de encapsidación y de dimerización y la PPT. Integrada en el genoma celular sólo queda entonces una única LTR que contiene el gen indicador. El gen cre se ha perdido igualmente durante la recombinación.

15 La secuencia de nucleótidos de interés, que es generalmente una secuencia extraña al retrovirus, se introduce de manera ventajosa en la región U3 de LTR3' de la secuencia retroviral. En efecto, la posibilidad de introducir secuencias, es decir, unidades transcripcionales completas, en la región U3 de LTR3' está muy bien documentada. Sin embargo, se puede plantear la introducción de secuencias de interés además de en la región U3 de LTR3' del vector retroviral. Los ejemplos incluyen la región U5 del LTR5'. Además, aunque sea preferible que el sitio de reconocimiento se sitúe inmediatamente por detrás o por delante de la secuencia de nucleótidos de interés, se puede asimismo colocar esta secuencia a una distancia apreciable que puede variar entre 32 nt y 4,5 Kb sin afectar a la integración final de la secuencia de interés en la célula objeto.

25 La cantidad de productos genéticos extraños introducida en la región U3 del ADN (vira) puede ser elevada y en ciertos casos superior a 4 kpb. Estas secuencias pueden corresponder incluso a una unidad transcripcional completa con un promotor independiente, lo que demuestra la polivalencia de estos vectores.

30 La posibilidad de introducir cantidades considerables de productos genéticos extraños en la 3' LTR del vector retroviral de la invención hace de este vector retroviral un sistema de elección para la inserción de secuencias de genes en células, más en particular en células eucariotas. Así pueden transformarse varios tipos de células eucariotas. Entre las células eucariotas que pueden usarse en el contexto de la presente invención, cabe destacar en particular los tipos de células siguientes: NIH3T3, BRL, HM1, D3, PLL4, LT.

35 La inserción de una secuencia de nucleótidos que codifica para un marcador está prevista en la región LTR3' del vector retroviral. La presencia de este marcador permite probar la inserción del producto nuevo.

A modo de ejemplos no limitativos, pueden usarse los marcadores siguientes: LacZ, GFP (*green fluorescent protein*), CD9, PAL (*alkaline phosphatase*) y HRP (*Horse Radish Peroxidase*).

40 Aunque el sistema de recombinasa Crelox constituye un sistema de elección para el vector retroviral de la invención, pueden usarse asimismo otros sistemas de recombinasa. A modo de ejemplos no limitativos, son utilizables los sistemas de recombinación siguientes: el sistema de levadura FLP (llamado "Flip") y el sistema bacteriano R.

45 Los vectores retrovirales de la invención suministran así un medio de transferencia eficaz de ADN en células hospedadoras. La integración proviral es precisa y no provoca reorganización cromosómica. La concepción de los vectores duplicadores partía del principio de que la transposición del gen en la LTR5', en el exterior de la unidad transcripcional retroviral, mejora su expresión.

50 Aunque la presencia de la señal de encapsidación hace posible la generación de un virus competente para la replicación por recombinación entre las secuencias del retrovirus y del provirus endógenas, la presencia de PPT y de otros elementos en cis hacen posible la transposición y la presencia de las secuencias PBS pudiera tener efectos negativos sobre la expresión del transgén, todos estos sucesos son muy improbables cuando se usa un vector retroviral según la invención, ya que todas estas secuencias virales son suprimidas.

55 El sistema de sLTR es un concepto nuevo en la construcción de retroelementos en general. Existen numerosos retrovirus cuyo espectro de hospedador de la partícula presenta un interés pero para los cuales la concepción de vectores necesita la presencia de ciertas secuencias cis o trans activas diferentes de las que se han citado anteriormente que permiten un ensamblaje correcto del virión y le permiten ser infeccioso como, por ejemplo, los virus humanos VIH, HTLV o el virus de cabra CAEV. Una vez integrados, los elementos cis o trans reguladores se vuelven inútiles para el gen transducido pero tienen efectos patógenos para la célula y aumentan significativamente las probabilidades de la reaparición de un virus silvestre. La necesidad de este tipo de secuencia para este tipo de retrovirus los hace prácticamente inutilizables para un uso como vectores. La aplicación del sistema sLTR de la presente invención para estos retrovirus permite abordar con más seguridad y más fiabilidad transcripcionales un uso como vectores para la transducción de genes.

65 La presente invención se describirá claramente en referencia a los ejemplos siguientes no limitativos y que hacen referencia a las figuras siguientes:

ES 2 276 407 T3

- la figura 1A representa la estructura del plásmido pMloxPL;
- la figura 1B representa la estructura del provirus MloxPL que se obtiene de la infección del retrovirus MloxPL;
- 5 - la figura 1C representa un provirus después de la recombinación inducida por cre que usa los dos sitios loxP en el interior de las LTR;
- la figura 1D representa un análisis por “Southern blot” del ADN celular procedente de fibroblastos NIH3T3 infectados por MloxPL;
- 10 - la figura 1E presenta un análisis por “Southern blot” del ADN celular que proviene del clon NIH3T3 MloxPL.1 transfectado por el plásmido pMC1-Cre;
- la figura 2A representa la estructura y el análisis molecular del provirus MloxPL que se obtiene de la infección del retrovirus MloxPL y de la recombinación inducida por Cre que usa los dos sitios loxP en el interior de las LTR;
- la figura 2B representa los resultados de un análisis por “Southern blot” del ADN celular procedente de fibroblastos NIH3T3 Cre.1 infectados por MloxPL con digestión por la endonucleasa de restricción *BclI* ;
- 20 - la figura 2C representa los resultados de un análisis por “Southern blot” del ADN celular procedente de fibroblastos NIH3T3 Cre.1 infectados por MloxPL con digestión por las endonucleasas *EcoRV*;
- la figura 3A representa la estructura del plásmido pMCreloxPL;
- 25 - la figura 3B representa un diagrama del 3' sLTR de algunas formas de realización preferentes del vector retroviral de la invención;
- la figura 3C representa los resultados de un análisis por “Southern blot” del ADN celular procedente de fibroblastos NIH3T3 infectados por MCreloxPL por digestión por la endonucleasa de restricción *BclI*;
- 30 - la figura 3D representa los resultados de un análisis por “Southern blot” del ADN celular procedente de fibroblastos NIH3T3 infectados por MCreloxPL por digestión por la endonucleasa de restricción *EcoRV*;
- la figura 3E representa los resultados de un análisis por “Southern blot” del ADN celular procedente de fibroblastos NIH3T3 infectados por MCreloxPL por digestión por la endonucleasa de restricción *KpnI*;
- 35 - la figura 4 representa un esquema del mecanismo de la generación de sTLR con el vector retroviral MCreloxPL.

Ejemplos

40 Nomenclatura

La nomenclatura de los diferentes vectores y las diferentes células se ha establecido como sigue: la p designa el vector plasmídico (por ejemplo, pMloxPL); los nombres con un $\psi 2$ (presentada el 10/3/1993 al ECAC con el número 45 93.031.002) designan la línea celular del virus silvestre auxiliar $\psi 2$ transfectado con este vector (por ejemplo, $\psi 2$ -MloxPL); los nombres sin p designan los virus producidos por las células del virus silvestre auxiliar (por ejemplo, MloxPL); el nombre de una línea celular seguido del nombre del virus indica que la línea celular contiene un provirus que se obtiene de una infección (por ejemplo, NIH3T3MloxPL).

50 Cultivo y selección de las células

Las líneas celulares establecidas NIH3T3 (fibroblastos de ratón) y $\psi 2$ (línea celular de encapsidación del retrovirus ecotrofo del ratón) se referencian en (7) y (13). Se cultivan en un DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco) de alto contenido en glucosa (4,5 g/l) completado con suero de ternera fetal al 5%. Las células se incuban a 37°C en 55 una atmósfera humidificada, que contiene el 12% de CO₂. Se añade G418 en el medio apropiado a una concentración de 600 mg/ml. La clonación de colonias resistentes al G418 se ha realizado por pipeteo de colonias individuales y aislamiento en una caja de cultivo distinta. La clonación de las células infectadas se realiza por dilución limitativa 48 horas después de la infección.

60 Transfección, infección, coloración de células y análisis de ácidos nucleicos por “Southern blot”

Se han realizado precipitados mediante fosfato de calcio según se describe en (12). El sobrenadante que contiene el virus se ha usado para infectar células NIH3T3 en presencia de 5 μ g/ml de polibreno, según se describe anteriormente en (37). Las hibridaciones por “Southern blot” se han preparado mediante el procedimiento de referencia (6). La 65 actividad β -galactosidasa se ha puesto de relieve por coloración con X-gal, según se ha descrito anteriormente en (38).

ES 2 276 407 T3

Detección de *LacZ* por PCR

La PCR se efectúa sobre 1 μ g de ADN celular genómico en una reacción de 40 μ l (Tris-HCl 50 mM (pH9), 150 μ g/ml de albúmina de suero bovino, $(\text{NH}_4)_2\text{OS}_4$ 16 mM, MgCl_2 7 mM, 250 μ M para cada dNTP, 1,25 U Taq DNApol (USB), 0,078 U Vent(exo+) DNApol (N.E. Biolabs)). Se han añadido cebos a una concentración final de 0,25 mM (para 20 meros). La reacción de la PCR se ha calentado a 80°C durante 5 minutos antes del inicio. 35 ciclos (94°C, 55 min.; 59°C, 30 s; 70°C, 3 min. 30 s) con los cebos siguientes: 5'-GCATCGAGCTGGGTAATAAGCGTTGGCAAT-3' y 5'-GACACCAGACCAATGGTAATGGTAGCGAC-3' para la detección de *LacZ* y 5'-GGACTGGGTGGCTTCAACTCCCAGACAC-3' y 5'-AGTTTCTCATTGCTGCGCGCCAGGTTTCAGG-3' para la detección del RAP-SYN endógeno de ratón, como testigo interno. Los productos de reacción de la PCR se han analizado por electroforesis sobre gel.

Ejemplo 1

15 Construcción del vector retroviral pMloxPL y transfección de líneas celulares

a) Construcción del vector pMloxPL

pMloxPL procede del plásmido pG-MPL (descrito en Choulika y col., 1995), en el que el sitio de reconocimiento *loxP* se inserta en el interior del sitio *NcoI* en un adaptador de enlace (5'-CATGCATATAACTTCGTATAGCATACAT TATACGAAGTTATC-3' y 5'-CATGGATAACTTCGTATAATGTATGCTTATCGAAGTTATATG-3'), en lugar del sitio *I-SceI*. La secuencia del sitio *loxP* se ha verificado por secuenciación del ADN.

El retrovirus usado se ilustra en la Fig. 1a. pMloxPL se construye a partir de un provirus de leucemia murina de Moloney defectuoso (desprovisto del gen *gag*, *pol* y *env*) insertando la secuencia que codifica para *PhleoLacZ* en la región U3 de la LTR de derecha en lugar de las secuencias de activación a distancia. El 5' obtenido del gen *PhleoLacZ* se ha colocado entre el sitio aceptor de empalme del gen *env* de MoMuLV y un sitio *loxP* largo de 32 pb obtenido del bacteriófago P1. En las células infectadas, este tipo de virus en la LTR contiene el gen activado por un promotor celular flanqueante por atrapamiento del promotor.

b) Transfección de líneas celulares con el plásmido pMloxPL

Las líneas celulares que producen el virus se han generado transfectando el plásmido pMloxPL con el plásmido de selección pUSVneo en la línea celular del virus silvestre auxiliar ψ 2 que expresa el virus silvestre auxiliar ecotrope defectuoso en encapsidación. Después de selección para G418 (neomicina), se han ensayado clones individuales seleccionados según su actividad β -galactosidasa para valorar el virus. La valoración se ha efectuado clonando células NIH3T3 inmediatamente después de infección por dilución limitativa, y detectando la presencia del provirus que contiene *LacZ* por PCR. Las líneas celulares productoras ψ 2-MloxPL.1 y ψ 2-MloxPL.2 han mostrado una valoración en la línea celular NIH3T3 de respectivamente $2,5 \times 10^4$ y 5×10^4 (Tabla 1). La valoración de las unidades que forman colonia azul por mililitro (BCFU/ml) del sobrenadante viral de ψ 2-MloxPL.1 y ψ 2-MloxPL.2 es respectivamente de 3 y 6, lo que corresponde a una proporción aproximada de 1 colonia azul en 10^4 integraciones. Como se ha descrito anteriormente, estos provirus funcionan como trampas de promotor, y solamente una integración de 10^4 expresa el gen indicador en la línea celular fibroblástica NIH3T3.

En la figura 1b se esquematizan las estructuras del ADN de los provirus MloxPL integrados. En las figuras del presente texto se indican las posiciones de las LTR y de los sitios de restricción *BclI* y los tamaños de los fragmentos (x indica el fragmento *BclI* de tamaño aleatorio del brazo izquierdo y el fragmento *BclI* de tamaño aleatorio del brazo derecho). P indica una sonda *LacZ* radiomarcada en el 32p. Estas estructuras se han analizado a continuación por hibridación por "Southern blot" en 6 clones NIH3T3 independientes. Los resultados de este análisis se presentan en la figura 1d. Todos los clones contienen un provirus en el que las secuencias en el interior de la región U3 de la 3'LTR se han duplicado en la 5'LTR; la digestión por la endonucleasa *BclI* genera el fragmento esperado por parte de los provirus con dos LTR que contienen *PhleoLacZ* (la enzima de restricción *BclI* en un sitio de reconocimiento en cada secuencia *LacZ* en los LTR). La hibridación por "Southern blot", que usa *LacZ* como sonda, muestra un fragmento de escisión de 6 kpb que demuestra una duplicación fiel de la región U3. Las dos bandas suplementarias de tamaños variables representan fragmentos que se extienden sitios *BclI* en el provirus hasta el ADN celular flanqueante. Las dos bandas suplementarias demuestran que existe una integración proviral por clon, y sus tamaños variables confirman que cada línea celular era un clon independiente.

Ejemplo 2

60 Cotransfección de líneas celulares con los plásmidos pMloxPL Y pMCI-Cre

Los autores de la invención han examinado si la duplicación *loxP* por medio de la LTR puede recombinarse con la recombinasa Cre. Han usado la línea celular clonal NIH3T3MloxPL.1 para dirigirse a una recombinación con la proteína Cre. Han cotransfectado en esta línea celular el vector de expresión pMCI-Cre con el vector de selección pUSVneo. La estructura del provirus después de la recombinación inducida por Cre se ilustra en la figura 1c.

Se ha analizado el ADN de 24 clones resistentes a la neomicina por hibridación por “Southern blot”. Se ha realizado la detección de los provirus recombinados analizando las digestiones de *BclI*. Se ha sondeado el ADN restringido a clones con un *LacZ* radiomarcado en el 32p. Los resultados de este análisis se ilustran en la figura 1e. La estructura parental del provirus muestra una banda de 6 kpb correspondiente a la duplicación fiel de la secuencia U3 que contiene *LacZ* y dos bandas suplementarias de 8 y 2 kpb (descritas anteriormente (Fig. 1b y d)). El análisis del ADN de los clones resistentes a la neomicina muestra 5 clones de 24 en los que se ha eliminado la banda de 6,0 kpb (Fig. 1e). Las bandas de 8 y 2 kpb correspondientes al ADN celular que flanquea al provirus estaban presentes siempre, demostrando así que el sitio de integración proviral no se ha reorganizado. Este resultado sugiere que la expresión del gen *cre* en una célula que contiene el provirus MloxPL puede conducir a una recombinación frecuente de los dos sitios *loxP* incluidos en las LTR.

Para probar la eficacia de la recombinación por medio de Crelox, los autores de la invención han analizado asimismo el ADN de 25 clones resistentes al G418 por hibridación por “Southern blot” con el fin de probar la presencia de la secuencia *cre*. El ADN se ha digerido con la endonucleasa de restricción *XhoI* y se ha sondeado con un ADN *cre* de longitud completa radiomarcado en el 32p. Los resultados de este análisis se ilustran en la figura 1e. Tres de los cinco clones recombinados en *loxP* muestran una banda que se hibrida con la sonda *cre* de 1,9 kpb, lo que sugiere que la unidad de expresión *cre* de longitud completa de pMC1-Cre está presente. Un de los cinco clones recombinados en *loxP* no mostraba banda que se hibridara con la sonda *cre*. Un clon recombinado en *loxP* muestra una banda de 5 kpb que se obtiene de una reorganización del plásmido pMC1-Cre. Otros cuatro clones que muestran una banda de 1,9 kpb que se hibrida *cre* no presentan recombinación en el provirus integrado MloxPL. Los autores de la invención no han detectado la presencia de ADN con *cre* en los 16 clones restantes. Este resultado muestra que la eficacia de la recombinación inducida por la presencia del plásmido pMC1-Cre no es absoluta en las líneas celulares transfectadas estables, en las que sólo el 50% de los sitios *loxP* están recombinados. Este resultado sugiere asimismo que la recombinación entre los dos sitios *loxP* puede obtenerse por la expresión efímera de pMC1-Cre (Tabla 2).

Ejemplo 3

Infección de células que expresan la enzima Cre con MloxPL

Los autores de la invención han producido una línea celular NIH3T3 que contiene el plásmido pMC1-Cre, por cotransfección de los plásmidos pMC1-Cre y pUSVneo. Se han seleccionado clones en un medio que contiene G418 y se ha analizado su ADN después de digestión con una endonucleasa de restricción *XhoI* por hibridación por “Southern blot”. La presencia del gen *Cre* se ha detectado por hibridación con una sonda de ADN *cre* de longitud completa radiomarcada en el 32p. Diez de los 12 clones resistentes al G418 analizados han revelado la presencia de la secuencia *Cre* en un número variable de copias (que van aproximadamente de 1 a 10 copia(s)) (datos no ilustrados).

Los autores de la invención han elegido el clon NIH3T3Cre.1 que contiene aproximadamente 10 copias del plásmido pMC1-Cre con fines de análisis complementario. Los autores de la invención han infectado el clon NIH3T3Cre.1 con el virus MloxPL. Los clones se han aislado por dilución limitativa.

La estructura del provirus que se obtiene de la infección del retrovirus MloxPL y de la recombinación inducida por *Cre* se ilustra en la figura 2a. La estructura del vector integrado es una LTR solitaria (sLTR). Faltan una LTR y todas las secuencias situadas entre las dos LTR en los provirus integrados (Fig. 2a y c).

Se ha analizado la estructura del ADN de los provirus MloxPL por hibridación por “Southern blot” después de digestión por la endonucleasa de restricción *BclI* de su ADN celular con el fin de detectar la presencia, o la ausencia, de LTR duplicadas en la estructura proviral. Según se demuestra en la figura 2b, el análisis de los 12 clones que se obtiene de la infección de NIH3T3Cre.1 por MloxPL ha demostrado la ausencia en todos los clones de la banda de 6 kpb indicadora de la duplicación.

Para demostrar la ausencia de la 5’LTR en el provirus, se ha realizado una restricción del ADN por *EcoRV*. La hibridación por “Southern blot” del ADN de NIH3T3Cre.1.MloxPL, restringido por la endonucleasa *EcoRV* usando una sonda *LacZ* radiomarcada (Fig. 2a y c), muestra la presencia de una banda de 2,1 kpb y de una banda de tamaño aleatorio. La ausencia de una banda de 3,9 kpb demuestra la ausencia de una 5’LTR.

Ejemplo 4

Construcción del vector retroviral pMCreloxPL y transfección de líneas celulares

a) *Construcción del plásmido pMCreloxPL*

La estructura de retrovirus usado en el presente ejemplo se ilustra en la Fig. 3a. pMCreloxPL procede de la inserción del gen *cre* de 1,3 kpb fusionado con una localización nuclear del gran antígeno T del virus de simio 40, entre las dos LTR del plásmido pMloxPL. El gen *cre* está bajo el control transcripcional del promotor del gen de la timidin-cinasa (*tk*) del virus del herpes simple flanqueado por una duplicación del activador a distancia del virus del poliovirus mutante PYF441 con adaptadores de enlace a la altura del sitio *PstI* de pMloxPL. La secuencia *Cre* está en la misma orientación que el genoma viral. El plásmido pMCreloxPL se ha presentado en la CNCM el 13 de junio de 1995 nº I-1599.

b) Transfección de líneas celulares con el plásmido pMCreloxPL

Se han generado líneas celulares que producen el virus cotransfectando el plásmido pMCreloxPL con el plásmido de selección pUSVneo en la línea celular de encapsidación $\psi 2$. Después de selección de las células $\psi 2$ transfectadas en un medio que contiene G418, se han seleccionado clones individuales para la producción de un retrovirus que expresa *LacZ*. Un clon ha producido un virus infeccioso; este clon se ha denominado $\psi 2$ -MCreloxPL.1. En $\psi 2$ -MCreloxPL.1, el plásmido pMCreloxPL se ha integrado en una sola copia en el genoma celular hospedador (datos no ilustrados). Las líneas celulares productoras de $\psi 2$ -MCreloxPL.1 producen 1×10^4 virus infecciosos por mililitro; la presencia del gen *LacZ* se detecta por PCR (Tabla 1). La valoración de las unidades que forman colonia azul por mililitro (BCFU/ml) del sobrenadante viral de $\psi 2$ -MCreloxPL.1 es de 3 BCFU/ml, lo que corresponde según se ha previsto a una disminución aproximada de 10^4 con respecto a la valoración por PCR. La producción de $\psi 2$ -MCreloxPL era de una eficacia baja comparada con la producción de $\psi 2$ -MloxPL, habiéndose recuperado un solo clon productor después de varias experiencias de cotransfección. Este clon había integrado una sola copia de la construcción plasmídica viral. Los autores de la invención han deducido que las células que integran más de una copia del plásmido no pueden recuperarse debido a la presencia de la actividad recombinasa que modifica los transgenes integrados.

c) Estructura proviral de MCreloxPL

El aislamiento de células NIH3T3 infectadas con MCreloxPL se ha realizado por dilución limitativa, después de infección con una multiplicidad de 0,5 partículas virales por célula. La estructura del provirus que se obtiene de la infección del retrovirus pMCreloxPL se ilustra en la figura 3b. En esta figura, α indica el fragmento de tamaño aleatorio del brazo izquierdo.

La estructura del ADN de los provirus integrados se ha analizado por hibridación por "Southern blot" en 6 clones NIH3T3MCreloxPL independientes. El análisis por "Southern blot" del ADN proviral restringido por las endonucleasas *BclI* y detectado con una sonda *LacZ* radiomarcada ha generado dos fragmentos de tamaños variables, y estos clones no han generado banda de 7,5 kpb suplementaria (Figura 3c). La ausencia de este fragmento suplementario de 7,5 kpb demuestra la presencia de una sola LTR que contiene *PhleoLacZ*. Para establecer además que la estructura proviral corresponde a una sola LTR, se ha emprendido un análisis suplementario. Para demostrar definitivamente la ausencia de una 5'LTR en el provirus, se ha realizado una restricción por *EcoRV* del ADN celular. La hibridación por "Southern blot" del ADN de NIH3T3MCreloxPL, restringido por la endonucleasa *EcoRV* usando una sonda *LacZ* radiomarcada (Fig. 3d), muestra la presencia de una banda de 2,1 kpb y de una banda de tamaño aleatorio. La ausencia de una banda de 6 kpb demuestra la ausencia de una 5'LTR. Este "blot" se ha hibridado a continuación con una sonda *cre* radiomarcada. La ausencia de una banda en el ADN de NIH3T3MCreloxPL muestra que el ADN proviral está desprovisto del gen *cre* (Fig. 3d). Finalmente, para establecer que la estructura de la LTR restante no estaba reorganizada, el ADN de NIH3T3MCreloxPL se ha restringido por la endonucleasa *KpnI* y se ha sondeado con un ADN de *LacZ* radiomarcado. En todos los casos se ha observado un fragmento de 4,3 kpb, demostrando que la LTR *PhleoLacZ* era del tamaño esperado (Fig. 3e). En consecuencia, todos los clones aislados contenían un provirus integrado por una sola LTR no reorganizada.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 276 407 T3

TABLA 1

Valoraciones de las líneas celulares ψ 2 MloxPL y MCreloxPL^a

Clon	IP/ml ^b (10 ⁴)	BCF/ml ^c	Relación ^d (10 ⁻⁴)
ψ 2-MloxPL.1	2,5	3	1,2
ψ 2-MloxPL.2	5	6	1,2
ψ 2-MCreloxPL.1	1	3	3

^a clones resistentes al G418 que provienen del clon NIH3T3MloxPL.1 cotransfectado con pMC1-Cre y pUSVneo.

^b Indica la presencia de la secuencia pMC1-Cre.

(+) Indica la presencia de un fragmento *Xho*I de 1,9 kpb correcto obtenido de pMC1Cre detectado con una sonda *cre* radiomarcada con ³²P.

(*) Indica la presencia de un fragmento *Xho*I que se hibrida la sonda *cre* radiomarcada con ³²P, pero de un tamaño incorrecto.

(-) Indica la ausencia del plásmido pMC1-Cre.

^c Resultados de la recombinación *loxP* por medio de Cre detectada por análisis por "Southern blot".

TABLA 2

Recombinación *loxP* por medio de una transfección pMC1-Cre

Número de clones resistentes al G418a	Presencia de pMC1-Cre ^b	Recombinación <i>loxP</i> ^c
3	+	+
1	-	+
1	*	+
4	+	-

TABLA 2 (continuación)

Nombre de clones resistentes al G418 ^a	Presencia de pMC1- Cre ^b	Recombinación <i>loxP</i> ^c
16	-	-

^a Se han transfectado células $\psi 2$ respectivamente con pM1oxPL+pUSVneo o pMCrelloxPL+pUSVneo, se han seleccionado clones resistentes al G418 en un medio que contiene G418. Se han preparado reservas de virus incubando 8 ml de medio con 5×10^6 células de cada clon resistentes al G418, habiéndose sometido 5×10^4 células NIH3T3 a diversas diluciones de virus durante 8 horas y a continuación se han clonado por dilución limitativa o se ha sometido a ensayo su actividad β -galactosidasa por coloración por X-gal.

^b Las valoraciones se han calculado por la relación entre los clones infectados aislado después de clonación y detectados por PCR (IP: partícula infecciosa) y los clones no infectados (PCR+/PCR-)/ 1×10^5 .

^c BCFU es el acrónimo de "blue colony forming unit" (unidad formadora de colonia azul). Las BCFU son infecciones que desembocan en una trampa del gen que activa el gen *PhleoLacZ* detectado por coloración por X-gal.

^d La relación es el número de BCFU por clon infectado.

Bibliografía

1. **Barker, D. D., H. Wu, S. Hartung, M. Breindl, and R. Jaenisch.** 1991. Retrovirus-induced insertional mutagenesis: mechanism of collagen mutation in Mov13 mice. *Mol. Cell. Biol.* 11:5154-5163.
2. **Choi, S. Y., and D. V. Faller.** 1994. The long terminal repeats of a murine retrovirus encode a trans-activator for cellular genes. *J. Biol. Chem.* 269:19691-19694.
3. **Choulika, A., A. Perrin, B. Dujon, and J. F. Nicolas.** 1994. Site-specific induction of homologous recombination in mammalian cells by I-Sce I system of *Saccharomyces cerevisiae*. Submitted to *Science*.
4. **Choulika, A., A. Perrin, B. Dujon, and J. F. Nicolas.** 1995. Induction of homologous recombination in mammalian chromosomes by using the I-Sce I system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 15:1968-1973.
5. **Chu, T.-H.T., and R. Dornburg.** 1995. Retroviral vector particles displaying the antigen-binding site of an antibody enable cell-type-specific gene transfer. *J. Virol.* 69:2659-2663.
6. **Church, G. M., and W. Gilbert.** 1984. Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:1991-1995.
7. **Eychene, A., C. Bechade, M. Marx, D. Laugier, P. Dezelee, and G. Calothy.** 1990. Molecular and biological properties of c-mil transducing retroviruses generated during passage of Rous-associated virus type 1 in chicken neuroretina cells. *J. Virol* 64:231-8.
8. **Felder, M. P., A. Eychene, J. V. Barnier, I. Calogeraki, G. Calothy, and M. Marx.** 1991. Common mechanism of retrovirus activation and transduction of c-mil and c-Rmil in chicken neuroretina cells infected with Rous-associated virus type 1. *J. Virol* 65:3633-40.

9. **Feuer, G., M. Taketo, R. C. Hanecak, and H. Fan.** 1989. Two blocks in Moloney murine leukemia virus expression in undifferentiated F9 embryonal carcinoma cells as determined by transient expression assays. *J. Virol.* 63:2317-2324.
- 5 10. **Flanagan, J. R., K. G. Becker, D. L. Ennist, S. L. Gleason, P. H. Driggers, B. Z. Levi, E. Appella, and K. Ozato.** 1992. Cloning of a negative transcription factor that binds to upstream conserved region of Moloney murine leukemia virus. *Mol. Cell Biol.* 12:38-44.
- 10 11. **Gama Sosa, M. A., D. H. Rosas, R. DeGasperi, E. Morita, M. R. Hutchinson, and R. Ruprecht.** 1994. Negative regulation of the 5' long terminal repeat (LTR) by the 3' LTR in the murine proviral genome. *Mol. Cell Biol.* 68:2662-2670.
- 15 12. **Graham, F. L., and A. J. van der Eb.** 1973. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52:456-467.
13. **Gu, H., Y. R. Zou, and K. Rajewsky.** 1993. Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting. *Cell.* 73:1155-1164.
- 20 14. **Hanley, T., and J. P. Merlie.** 1991. Transgene detection in unpurified mouse tail DNA by polymerase chain reaction. *BioTechnics.* 10:56.
- 25 15. **Hantzopoulos, P. A., B. A. Sullenger, G. Ungers, and E. Gilboa.** 1989. Improved gene expression upon transfer of the adenosine deaminase minigene outside the transcriptional unit of a retroviral vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:3519-3523.
- 30 16. **Hoeben, R. C., A. A. Migchielsen, d. J. R. van, O. H. van, and d. E. A. van.** 1991. Inactivation of the Moloney murine leukemia virus long terminal repeat in murine fibroblast cell lines is associated with methylation and dependent on its chromosomal position. *J. Virol* 65:904-12.
- 35 17. **Joyner, A. L.** 1991. Gene targeting and gene trap screens using embryonic stem cells: New approaches to mammalian development. *BioEssays* 13:649-656.
18. **Kasahara, N., A. M. Dozy, and Y. W. Kan.** 1994. Tissues-specific targeting of retroviral vectors through ligand-receptor interactions. *Science* 266:1373-1376.
- 35 19. **Kilby, N. J., M. R. Snaith, and J. A. H. Murray.** 1993. Site-specific recombinases: tools for genome engineering. *Reviews* 9:413-421.
- 40 20. **Linney, E., B. Davis, J. Overhauser, E. Chao, and H. Fan.** 1984. Non-function of Moloney murine leukaemia virus regulatory sequence in F9 embryonal carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3748-3752.
21. **Lochet, M., M. Aboud, and R. M. Flugel.** 1993. Increase in the basal transcriptional activity of the human foamy virus internal promoter by the homologous long terminal repeat promoter in cis. *NAR* 21:4226-4230.
- 45 22. **Loh, T. P., L. L. Sievert, and R. W. Scott.** 1988. Negative regulation of retrovirus expression in embryonal carcinoma cells mediated by an intragenic domain. *J. Virol.* 62:4086-4095.
23. **Loh, T. P., L. L. Sievert, and R. W. Scott.** 1990. Evidence for a stem cell-specific repressor of Moloney murine leukemia virus expression in embryonal carcinoma cells. *Mol. Cell. Biol.* 10:4045-4057.
- 50 24. **Loh, T. P., L. L. Sivert, and R. W. Scott.** 1987. Proviral sequences that restrict retroviral expression in mouse embryonal carcinoma cells. *Mol. Cell. Biol.* 7:3775-3784.
25. **Mann, R., R. C. Mulligan, and D. Baltimore.** 1983. Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus. *Cell.* 33:153-160.
- 55 26. **Mansour, S. L., K. R. Thomas, and C. M. R.** 1988. Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature* 336:348-352.
- 60 27. **Miller, A. D., D. R. Trauber, and C. Buttimore.** 1986. Factors involved in the production of helper virus-free retrovirus vector. *Somatic Cell. Mol. Genet.* 12:175-183.
28. **Morgan, R. A., L. Couture, O. Elroy-Stein, J. Ragheb, B. Moss, and W. F. Anderson.** 1992. Retroviral vectors containing putative internal ribosome entry sites: development of a polycistronic gene transfer and applications to human gene therapy. *N.A.R.* 20:1293-1299.
- 65 29. **Nicolas, J. F., and C. Bonnerot.** 1993. Répression et activation des rétrovirus murins dans les cellules totipotentes. *Médecine/Sciences* 9:191-197.

30. **Nicolas, J. F., and J. Rubenstein.** 1987. Retroviral vectors, p. 493-512. In E. Biotechnology series - Julian E. Davies (ed.), *Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses.* Butterworths, Boston London Durban Singapore Sydney Toronto Wellington.
- 5 31. **Pear, W. S., G. P. Nolan, M. L. Scott, and D. Baltimore.** 1993. Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:8392-8396.
32. **Peters, G., A. E. Lee, and C. Dickson.** 1986. Concerted activation of two potential proto-oncogenes in carcinomas induced by mouse mammary tumour virus. *Nature* 320:628-631.
- 10 33. **Petersen, R., G. Kempler, and E. Barklis.** 1991. A stem cell-specific silencer in the primer-binding site of a retrovirus. *Mol. Cel. Biol.* 11:1214-1221.
34. **Pulsinelli, G. A., and H. M. Temin.** 1991. Characterization of large deletions occurring during a single round of retrovirus vector replication: novel deletion mechanism involving errors in strand transfer. *J. Virol.* 65:4786-4797.
- 15 35. **Reddy, S., J. V. DeGregori, H. Von Melchner, and H. E. Ruley.** 1991. Retrovirus promoter-trap vector to induce LacZ gene fusions in mammalian cells. *J. Virol.* 65:1507-1515.
36. **Reddy, S., H. Rayburn, V. M. H., and R. H. E.** 1992. Fluorescence-activated sorting of totipotent embryonic stem cells expressing developmentally regulated *lacZ* fusion genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89:6721-6725.
- 20 37. **Rubenstein, J., J. F. Nicolas, and F. Jacob.** 1984. Construction of a retrovirus capable of transducing and expressing genes in multipotential embryonic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:7137-7140.
- 25 38. **Sanes, J., J. Rubenstein, and J. F. Nicolas.** 1986. Use of a recombinant retrovirus to study post-implantation cell lineage in mouse embryos. *EMBO J.* 5:3133-3142.
39. **Sauer, B.** 1987. Functional expression of the *cre-lox* site-specific recombination system in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cel. Biol.* 7:2087-2096.
- 30 40. **Sauer, B., and N. Henderson.** 1988. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5166-5170.
- 35 41. **Savatier, N., D. Rocancourt, C. Bonnerot, and J.-F. Nicolas.** 1989. A novel system for screening antiretroviral agents. *J. Virol.* 26:229-236.
42. **Shafer, G. E., D. W. Emery, K. Gustafsson, S. Germana, W. F. Anderson, D. H. Sachs, and C. LeGuern.** 1991. Expression of a swine class II gene in murine bone marrow hematopoietic cells by retroviral mediated gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:9760-9764.
- 40 43. **Sternberg, N., B. Sauer, R. Hoess, and K. Abremski.** 1986. Bacteriophage P1 *cre* gene and its regulatory region. Evidence for multiple promoter and for regulation by DNA methylation. *J. Mol. Biol.* 187:197-212.
- 45 44. **Stevenson, M., S. Haggerty, C. A. Lamonica, C. M. Meier, S. K. Welch, and A. J. Wasiak.** 1990. Integration is not necessary for expression of human immunodeficiency virus type 1 protein products. *J. Virol.* 64:2421-2425.
45. **Stuhlmann, H., and P. Berg.** 1992. Homologous recombination of copackaged retrovirus RNAs during reverse transcription. *J. Virol.* 66:2378-2388.
- 50 46. **Swanstrom, R., R. C. Parker, H. E. Varmus, and J. M. Bishop.** 1983. Transduction of a cellular oncogene: the genesis of Rous sarcoma virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:2519-2523.
47. **Takeuchi, Y., G. Simpson, R. G. Vile, R. A. Weiss, and M. K. Collins.** 1992. Retroviral pseudotypes produced by rescue of a Moloney murin leukemia virus vector by C-type, but not D-type, retrovirus. *Virology* 186:792-794.
- 55 48. **Tramblay, P. J., C. A. Kozak, and P. Jolicoeur.** 1992. Identification of a novel gene, Vin-1, in murine leukemia virus-induced T-cell leukemias by provirus insertional mutagenesis. *J. Virol.* 66:1344-1353.
- 60 49. **Trusko, S. P., E. K. Hoffman, and D. L. George.** 1989. Transcriptional activation of cKi-ras proto-oncogene resulting from retroviral promoter insertion. *N.A.R.* 17:9259-9265.
50. **Varela-Echavarria, A., C. M. Prorock, Y. Ron, and J. P. Dougherty.** 1993. High rate of genetic rearrangement during replication of Moloney murin leukemia virus-based vector. *J. Virol.* 67:6357-6364.
- 65 51. von **Melchner, H., and H. E. Ruley.** 1989. Identification of cellular promoters by using a retrovirus promoter trap. *J. Virol.* 63:3227-3233.

ES 2 276 407 T3

52. **Weiss, R., N. Teich, H. Varmus, and J. Coffin.** 1985. RNA tumor viruses, p. 1222. (ed.), Molecular Biology of tumor viruses. *Cold Spring Harbor Laboratory*.

53. **Yee, Y. K., J. C. Moores, D. J. Jolly, J. A. Wolff, J. G. Respass, and T. Friedmann.** 1987. Gene expression from transcriptionally disabled retroviral vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:5197-5201.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Polinucleótido que comprende

5 (a) la secuencia LTR3' o LTR5' de un retroelemento natural o sintético; y

(b) una secuencia de inserción que comprende una secuencia de nucleótidos de interés así como, para un sistema de recombinación dado, una única secuencia de reconocimiento de una recombinasa,

10 estando insertada dicha secuencia de inserción en dicha LTR3' o dicha LTR5', de manera que permita la inserción, por intervención de un vector retroviral, de dicha secuencia de interés en el genoma de una célula hospedadora, sin que se inserten secuencias provirales que no son ya necesarias después de la integración de la secuencia de interés en el genoma de la célula hospedadora.

15 2. Polinucleótido según la reivindicación 1, **caracterizado** porque dicha secuencia de inserción se incorpora en la región U3 de la LTR3', U5 de la LTR5' o R de la LTR.

20 3. Polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, **caracterizado** porque el retroelemento es una secuencia de ADN retroviral.

4. Polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque dicha secuencia de reconocimiento que puede ser reconocida por una recombinasa se sitúa por delante de dicha secuencia de nucleótidos de interés.

25 5. Polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque dicha secuencia de reconocimiento que puede ser reconocida por una recombinasa se sitúa por detrás de dicha secuencia de nucleótidos de interés.

30 6. Polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque la secuencia de reconocimiento comprende el sitio de reconocimiento LoxP.

35 7. Polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque la secuencia de nucleótidos de interés comprende una secuencia que codifica para una proteína o un ARN de interés, en particular un ARN antisentido o una secuencia ribozima.

8. Polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque la secuencia de nucleótidos de interés comprende además elementos de regulación.

40 9. Polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para una recombinasa susceptible de reconocer dicha secuencia de reconocimiento.

45 10. Polinucleótido según la reivindicación 9, **caracterizado** porque dicha secuencia de nucleótidos que codifica para una recombinasa se sitúa entre las regiones LTR5' y LTR3' de dicho vector.

11. Polinucleótido según la reivindicación 10, **caracterizado** porque la secuencia de nucleótidos que codifica para una recombinasa codifica para la proteína Cre.

50 12. Polinucleótido según la reivindicación 11, contenido en el plásmido presentado el 13 de junio de 1995 en la CNCM con el nº I-1599.

13. Vector retroviral **caracterizado** porque comprende un polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.

55 14. Vector retroviral según la reivindicación 13, **caracterizado** porque dicho vector es un provirus de leucemia murina de Moloney defectuoso que comprende dicha secuencia de reconocimiento en su región U3 del LTR3', U5 del LTR5' o R.

60 15. Hospedador celular que ha integrado en su genoma una estructura proviral que comprende una sola secuencia LTR de un vector retroviral según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 14, comportando dicha secuencia LTR una copia única de una secuencia de nucleótidos de interés.

65 16. Hospedador celular según la reivindicación 15, **caracterizado** porque se trata de una célula eucariota y porque la estructura proviral está libre esencialmente de secuencias PBS, de señal de encapsulación y de dimerización y de PPT.

ES 2 276 407 T3

17. Procedimiento de introducción de un gen en una célula hospedadora en cultivo, **caracterizándose** dicho procedimiento porque comprende la infección de dicha célula hospedadora por el vector retroviral según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 14.

5 18. Procedimiento de expresión de una molécula codificada por una secuencia de interés en una célula hospedadora en cultivo, **caracterizándose** dicho procedimiento porque comprende:

- la infección de dicha célula hospedadora por un vector retroviral según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 14 que comprende dicha secuencia de nucleótidos de interés;

10 - el crecimiento de dicha célula hospedadora en condiciones que permiten la expresión de dicha secuencia de nucleótidos de interés; y

15 - la obtención de la molécula deseada.

19. Uso de un polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para la fabricación de una composición que permite la producción por células hospedadoras de proteínas o de ARN codificados por una secuencia de nucleótidos de interés.

20 20. Uso de un vector retroviral según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 14, para la fabricación de una composición que permite la producción por células hospedadoras de proteínas codificadas por una secuencia de nucleótidos de interés.

25 21. Polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para su uso en el tratamiento médico de un paciente.

22. Vector retroviral según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 14, para su uso en el tratamiento médico de un paciente.

30 23. Composición farmacéutica que comprende un vector retroviral según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 14 en combinación con un excipiente farmacéutico aceptable.

24. Composición farmacéutica constituida por células hospedadoras según la reivindicación 15 ó 16.

35

40

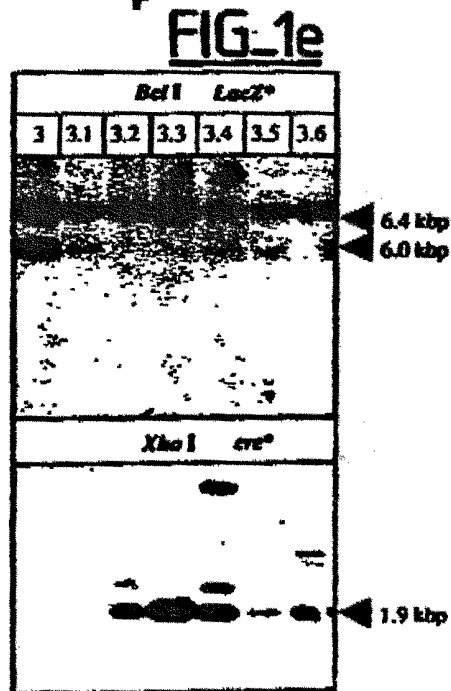
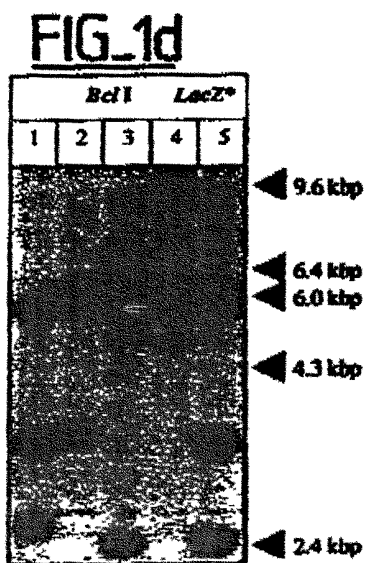
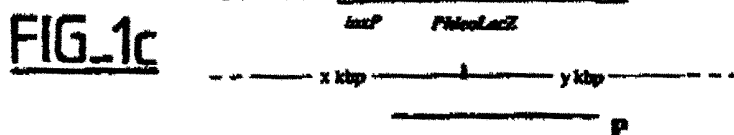
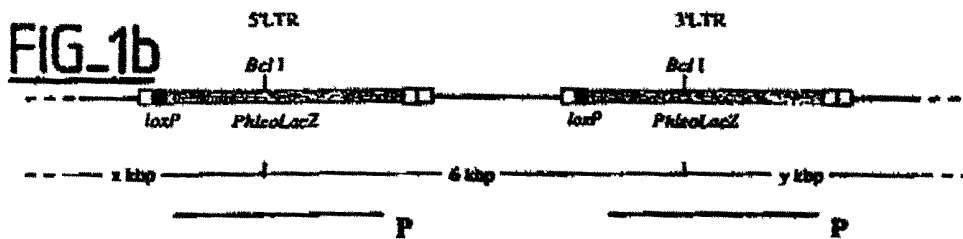
45

50

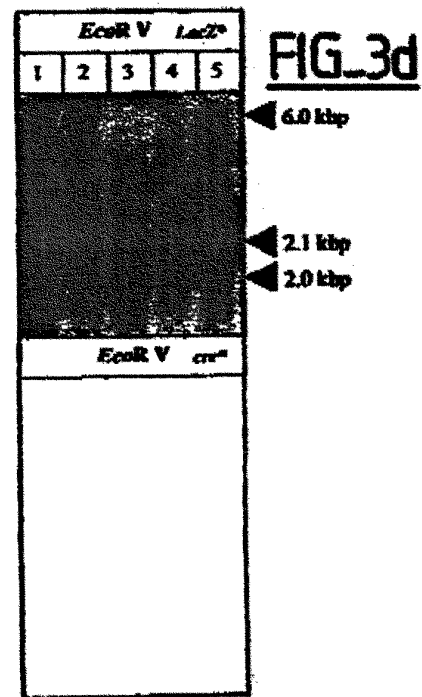
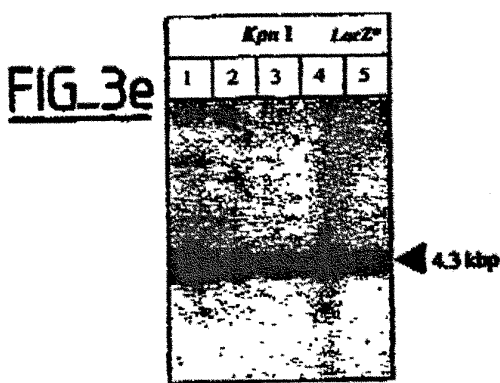
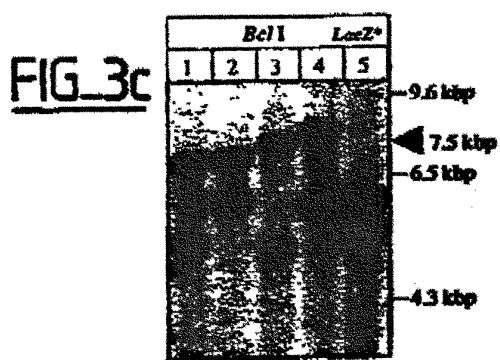
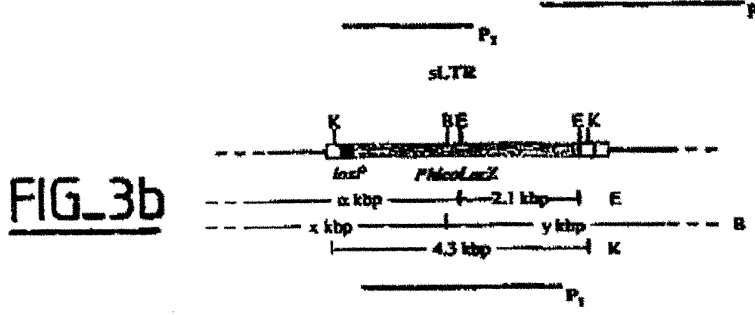
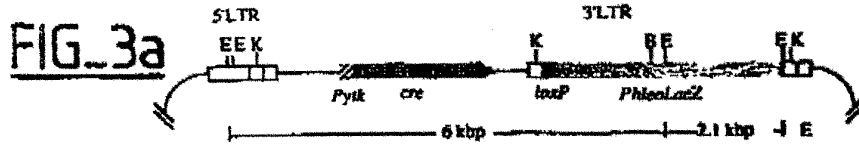
55

60

65



□	LTR	≥ 1.8 kbp
▨	PheoLacZ	≥ 2.5 kbp
■	loxP	
-	-ADN celular	



□	LTR	E : EcoR V
⊗	PhleoLoxZ	B : Bcl I
■	loxP	
■	cre	
⊘	Promotor Pytk	Kpn I
-	ADN celular	

≥ 1.8 kbp	≥ 1.9 kbp
≥ 2.5 kbp	

