

OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 959 326**

⑮ Int. Cl.:

**C12N 5/10** (2006.01)  
**C12N 7/02** (2006.01)  
**C12N 7/04** (2006.01)  
**C12N 15/85** (2006.01)

⑫

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.11.2016 E 19151187 (2)**

⑯ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.07.2023 EP 3489353**

⑮ Título: **Líneas celulares estables para producción retroviral**

⑯ Prioridad:

**24.11.2015 GB 201520761**  
**26.05.2016 GB 201609303**

⑯ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**23.02.2024**

⑯ Titular/es:

**GLAXOSMITHKLINE INTELLECTUAL PROPERTY DEVELOPMENT LIMITED (100.0%)**  
**GSK Medicines Research Centre Gunnels Wood Road Stevenage SG1 2NY, GB**

⑯ Inventor/es:

**JOHNSON, SABINE;**  
**PALLANT, CELESTE;**  
**VAMVA, EIRINI y**  
**VINK, CONRAD**

⑯ Agente/Representante:

**ARIZTI ACHA, Monica**

**ES 2 959 326 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

Líneas celulares estables para producción retroviral

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a vectores de ácido nucleico que comprenden genes requeridos para la producción retroviral y a usos de los mismos. También se proporcionan métodos para producir líneas celulares productoras/de empaquetamiento retroviral que comprenden los vectores de ácido nucleico como se describen en la presente.

10

10 **Antecedentes de la invención**

En la terapia génica, el material genético se administra a las células endógenas en un sujeto en necesidad de tratamiento. El material genético puede introducir nuevos genes al sujeto, o introducir copias adicionales de genes preexistentes, o introducir diferentes alelos o variantes de genes que están presentes en el sujeto. Se han propuesto sistemas de vectores virales como un método de administración de genes efectivo para usarse en terapia génica (Verma y Somia (1997) *Nature* 389: 239-242).

15

En particular, estos vectores virales se basan en miembros de la familia de retrovirus debido a su capacidad para integrar su carga genética en el genoma del huésped. Los vectores retrovirales se diseñan para mantener las proteínas esenciales requeridas para el empaquetamiento y la administración del genoma retroviral, pero se retiran todas las proteínas auxiliares no esenciales, incluyendo aquellas responsables de su perfil de enfermedad. Los ejemplos de vectores retrovirales incluyen vectores lentivirales, tales como aquellos basados en el virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), que se usan ampliamente debido a que son capaces de integrarse en células no proliferantes.

20

Actualmente, la mayoría de los vectores virales se producen por cotransfección transitoria de genes virales en una línea de células huésped. Los genes virales se introducen usando plásmidos bacterianos que existen en la célula huésped sólo durante un período de tiempo limitado debido a que los genes virales permanecen en los plásmidos y no se integran en el genoma. Como tal, el material genético transfectado transitoriamente no se pasa a las generaciones posteriores durante la división celular.

25

30 Existen varios inconvenientes asociados con la transfección transitoria, tales como la variabilidad entre lotes, el alto coste de los reactivos de transfección y la dificultad para mantener el control de calidad (véase Segura *et al.* (2013) *Expert Opin. Biol. Ther.* 13(7): 987-1011). El proceso de transfección mismo también requiere mucha mano de obra y es difícil de ampliar. También existe la difícil tarea de retirar las impurezas de plásmidos que se arrastran durante la preparación de vector (véase Pichlmair *et al.* (2007) *J. Virol.* 81(2): 539-47).

35

40 A fin de abordar los problemas asociados con la transfección transitoria, ha habido un deseo de desarrollar líneas celulares productoras y de empaquetamiento retroviral a fin de simplificar la producción de vector retroviral.

45

Las líneas celulares de empaquetamiento se han generado al transfectar una línea celular capaz de empaquetar vectores retrovirales con plásmidos, donde los plásmidos individuales portan los genes de empaquetamiento retroviral y marcadores de selección eucariotas únicos. Los genes de empaquetamiento se integran en el genoma de la línea celular de empaquetamiento y se describen como que están transfectados de manera estable. En los últimos 20 años se han hecho varios intentos para generar líneas celulares productoras y de empaquetamiento estables para vectores retrovirales.

50

55 En el documento WO2012/028681 se describen métodos para preparar líneas celulares de empaquetamiento lentiviral semi-estables utilizando un vector híbrido baculo-virus adenoasociado (AAV). En el documento WO2003/064665 se describe un sistema de producción lentiviral independiente de rev para producir una partícula de vector derivada del lentivirus.

60

65 Se han notificado muchos problemas en las líneas celulares productoras y de empaquetamiento producidas mediante la integración de componentes de vector retroviral en el genoma de célula huésped. En el primer caso, la introducción secuencial de componentes de vector retroviral puede ser laboriosa e inflexible. También ha habido problemas con inestabilidad genética y/o transcripcional de componentes de vector retroviral cuando se integran en el genoma de célula huésped debido a que el sitio de integración es impredecible (Ni *et al.* (2005) *J. Gene Med.* 7: 818-834.). También se ha notificado una caída significativa en la productividad de vector viral durante la adaptación de suspensión y el aumento de las líneas celulares productoras (Farson *et al.* (2001) *Hum. Gene Ther.* 12: 981- 997; Guy *et al.* (2013) *Hum. Gene Ther. Methods.* 24(2): 125-39).

Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es proporcionar un método de producción de líneas celulares productoras y de empaquetamiento retroviral estables que supere una o más de las desventajas asociadas con los

métodos existentes.

### Sumario de la invención

5 Los presentes inventores han desarrollado una nueva forma de producir líneas celulares productoras y de empaquetamiento que implica el uso de vectores de ácido nucleico que comprenden un origen de replicación no de mamífero y la capacidad de contener al menos 25 kilobases (kb) de ADN, tal como cromosomas artificiales bacterianos, que comprenden los genes retrovirales esenciales para la producción de vectores retrovirales. Esto permite la expresión de los genes retrovirales requeridos para la producción de partículas de vector retroviral defectuosas en replicación para mejorar los problemas asociados con los métodos de transfección transitoria.

10 El uso de un vector de ácido nucleico que comprende un origen de replicación no de mamífero y que tiene la capacidad de contener al menos 25 kb de ADN (es decir, ADN de constructo grande) tiene varias ventajas. En el primer caso, los vectores se pueden manipular primero en células no de mamífero (por ejemplo, células microbianas, 15 tal como células bacterianas) en lugar de células huésped de mamífero, lo que las hace mucho más fáciles de usar (por ejemplo, los cromosomas artificiales bacterianos se pueden manipular primero en *E. coli*). Una vez que se ha preparado el vector de ácido nucleico, se puede introducir en una célula huésped de mamífero y se puede seleccionar cualquier célula de mamífero que tenga el vector de ácido nucleico integrado en los cromosomas endógenos a fin de aislar una línea celular estable.

20 25 La introducción de los ácidos nucleicos retrovirales en la célula huésped de mamífero también se produce en una única etapa lo cual ayuda a reducir la presión de selección y el período de tiempo de silenciamiento. Esto permite una examinación más rápida de células de empaquetamiento potenciales y reduce el coste de los materiales debido a que sólo se usa un vector individual, en lugar de los métodos anteriores que usan múltiples vectores de plásmidos. En particular, el uso del sistema actual reduce el coste de fabricación al ahorrar en costes de plásmido, reactivos de transfección requeridos (por ejemplo, polietilenimina [PEI]), reduciendo la cantidad de tratamiento con benzonasa requerida (hay una cantidad reducida de ADN en la recolección lentiviral, por lo tanto, se necesita menos benzonasa para retirar el exceso en el procesamiento posterior) y el coste reducido de la prueba (no hay necesidad de realizar pruebas para detectar plásmido residual en el producto lentiviral).

30 35 Además, los genes retrovirales esenciales para la producción retroviral (con o sin el vector de transferencia) están presentes dentro del vector de ácido nucleico de modo que cuando se introduce el vector en células huésped de mamífero, todos los genes retrovirales incorporados en el vector de ácido nucleico se integrarán en un locus dentro del genoma de célula huésped de mamífero endógeno. Esto puede superar problemas tales como el silenciamiento de genes que se puede presentar cuando los genes retrovirales se integran aleatoriamente y en diferentes locus dentro del genoma de célula huésped.

40 Por lo tanto, el uso de vectores de ácido nucleico de la invención proporciona ventajas en la generación de líneas celulares productoras y de empaquetamiento retroviral.

45 En un aspecto de la invención, se proporciona un vector de ácido nucleico que comprende un origen de replicación no de mamífero, uno o una pluralidad de sitios de recombinación y la capacidad de contener al menos 25 kilobases (kb) de ADN seleccionado de: un cromosoma artificial bacteriano (BAC), un cromosoma artificial de levadura (YAC), un cromosoma artificial derivado de P1, un fósrmido o un cósmido, que comprende secuencias de ácidos nucleicos retrovirales que codifican para:

proteínas de gag y pol, y

una proteína de env retroviral,

50 en donde cada una de las secuencias de ácido nucleico retroviral está dispuesta como constructos de expresión individuales dentro del vector de ácido nucleico.

55 En otro aspecto de la invención, se proporciona un método para producir una línea celular de empaquetamiento retroviral estable, que comprende:

60 (a) introducir un vector de ácido nucleico que comprende un origen de replicación no de mamífero, uno o una pluralidad de sitios de recombinación y la capacidad de contener al menos 25 kilobases (kb) de ADN seleccionado de: un cromosoma artificial bacteriano (BAC), un cromosoma artificial de levadura (YAC), un cromosoma artificial derivado de P1, un fósrmido o un cósmido, que comprende secuencias de ácidos nucleicos retrovirales que codifican para:

proteínas de gag y pol, y

una proteína de env retroviral,

en donde cada una de las secuencias de ácido nucleico retroviral tiene su propio promotor dentro del vector de ácido nucleico, en un cultivo de células huésped de mamífero; y

5 (b) seleccionar dentro del cultivo una célula huésped de mamífero que tiene las secuencias de ácido nucleico codificadas en el vector integradas en un cromosoma endógeno de la célula huésped de mamífero.

10 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un método para producir una partícula de vector retroviral defectuosa en replicación, que comprende:

(a) introducir el vector de ácido nucleico que comprende un origen de replicación no de mamífero, uno o una pluralidad de sitios de recombinación y la capacidad de contener al menos 25 kilobases (kb) de ADN seleccionado de:

15 un cromosoma artificial bacteriano (BAC), un cromosoma artificial de levadura (YAC), un cromosoma artificial derivado de P1, un fósrmido o un cósmido, que comprende secuencias de ácidos nucleicos retrovirales que codifican para:

proteínas de gag y pol, y

20 una proteína de env retroviral,

en donde cada una de las secuencias de ácido nucleico retroviral tiene su propio promotor dentro del vector de ácido nucleico, en un cultivo de células huésped de mamífero;

25 (b) seleccionar dentro del cultivo una célula huésped de mamífero que tiene las secuencias de ácido nucleico codificadas en el vector integradas en un cromosoma endógeno de la célula huésped de mamífero; y

(c) cultivar adicionalmente la célula huésped de mamífero en condiciones en las que se produce la partícula de vector retroviral defectuosa en replicación.

### 30 Breve descripción de las figuras

Figura 1: una guía paso a paso para la construcción de BACpack-WTGP-277delU5 y BACpack-SYNGP-277delU5.

35 Figura 2: selección de una agrupación policonal estable. Las células adherentes HEK293T se transfecaron con BACpackWTGagPol-Transfer usando fosfato de calcio. Las agrupaciones estables se generaron después de 2 semanas de selección con zeocina. Para ver si los transfectantes estables eran capaces de generar virus, las agrupaciones de poli estables se indujeron con doxiciclina durante 48 horas. El sobrenadante viral se recolectó 48 horas después de la inducción, se filtró a través de un filtro de 0,22 µm y se tituló por la transducción de células HEK293T. Las células transducidas positivas para GFP se utilizaron para calcular las unidades de transducción/ml (TU/ml).

40 Figura 3: generación de clones de suspensión de transfección estables. Las células HEK293 6E se transfecaron con BACpackWTGagPol-Transfer utilizando el reactivo 293fectin. Las agrupaciones estables se generaron después de 2 semanas de selección con zeocina. Las agrupaciones estables se clonaron por dilución limitante en placas de 96 pocillos para obtener clones de células individuales, que posteriormente se expandieron. GFP detectada por microscopía de fluorescencia de los mejores clones 1, 14, 15 y 16, obtenidos con medio adherente (DMEM + FBS) seguido por adaptación de suspensión (medio FreeStyle).

45 Figura 4: inducción de lentivirus en los clones en suspensión. Para ver si los transfectantes de HEK6E estables eran capaces de generar virus, se indujeron 20 ml de los clones en suspensión estables con doxiciclina (2 µg/ml) durante 48 horas. El sobrenadante viral se recolectó 48 horas después de la inducción, se filtró a través de un filtro de 0,45 µm y se tituló por la transducción de células HEK293T. Las células transducidas positivas para GFP se utilizaron para calcular las unidades de transducción/ml (TU/ml).

50 Figura 5: títulos de vector de clones producidos de acuerdo con el ejemplo 4. Los resultados muestran que los títulos de vector de los clones 1 y 16 incrementaron moderadamente entre el pase 5 y el pase 21.

### 60 Descripción detallada de la invención

#### Definiciones

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado que entienden comúnmente los expertos en la materia a la cual pertenece esta invención.

El término "que comprende" abarca "que incluye" o "que consiste en", por ejemplo, una composición "que comprende" X puede constar exclusivamente de X o puede incluir algo adicional, por ejemplo, X + Y.

5 El término "que consiste esencialmente en" limita el alcance de la peculiaridad a los materiales o etapas especificados y aquellos que no afecten sustancialmente a la(s) característica(s) básica(s) de la peculiaridad reivindicada.

10 El término "que consta de" excluye la presencia de cualquier componente adicional.

10 El término "aproximadamente" con relación a un valor numérico x significa, por ejemplo,  $x \pm 10\%$ , 5%, 2% o 1%.

15 El término "vector" o "vector de ácido nucleico" se refiere a un vehículo que es capaz de portar artificialmente material genético extraño (es decir, exógeno) a otra célula, donde se puede replicar y/o expresar. Los ejemplos de vectores incluyen vectores de ácido nucleico no de mamífero, tales como cromosomas artificiales bacterianos (BAC), cromosomas artificiales de levadura (YAC), cromosomas artificiales derivados de P1 (PAC), cósmidos o fósvidos.

20 Otros ejemplos de vectores incluyen vectores virales, tales como vectores retrovirales y lentivirales, que son de particular interés en la presente solicitud. Los vectores lentivirales, tales como aquellos basados en el virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) se usan ampliamente puesto que son capaces de integrarse en células no proliferantes. Los vectores virales se pueden volver defectuosos en la replicación al dividir el genoma viral en partes separadas, por ejemplo, mediante colocación en plásmidos separados. Por ejemplo, la denominada primera generación de vectores lentivirales, desarrollada por el Instituto Salk para Estudios Biológicos, se construyó como un sistema de expresión de tres plásmidos que consta de un casete de expresión de empaquetamiento, el casete de expresión de envoltura y el casete de expresión de vector. El "plásmido de empaquetamiento" contiene las secuencias de *gag-pol* completas, las secuencias reguladoras (*tat* y *rev*) y las auxiliares (*vif*, *vpr*, *vpu*, *nef*). El "plásmido de envoltura" contiene la glicoproteína de virus de estomatitis vesicular (VSVg) en sustitución de la proteína de envoltura de VIH-1 nativa, bajo el control de un promotor de citomegalovirus (CMV). El tercer plásmido (el "plásmido de transferencia") lleva las repeticiones terminales largas (LTR), la secuencia de encapsulación (*ψ*), la secuencia de elemento de respuesta a Rev (RRE) y el promotor de CMV para expresar el transgén dentro de la célula huésped.

30 35 La segunda generación de vector lentiviral se caracterizó por la eliminación de las secuencias de virulencia *vpr*, *vif*, *vpu* y *nef*. El vector de empaquetamiento se redujo a los genes *gag*, *pol*, *tat* y *rev*, incrementando de esta manera la seguridad del sistema.

40 Para mejorar el sistema lentiviral, los vectores de tercera generación se han diseñado al retirar el gen *tat* del constructo de empaquetamiento y al inactivar la LTR del casete de vector, reduciendo de esta manera los problemas con relación a los efectos de mutagénesis de inserción.

45 45 Las diversas generaciones de lentivirus se describen en las siguientes referencias: primera generación: Naldini *et al.* (1996) *Science* 272(5259): 263-7; segunda generación: Zufferey *et al.* (1997) *Nat. Biotechnol.* 15(9): 871-5; tercera generación: Dull *et al.* (1998) *J. Virol.* 72(11): 8463-7. Una publicación sobre el desarrollo de vectores lentivirales puede encontrarse en Sakuma *et al.* (2012) *Biochem. J.* 443(3): 603-18 y Picanço-Castro *et al.* (2008) *Exp. Opin. Therap. Patents* 18(5):525-539.

50 55 La expresión "origen de replicación no de mamífero" se refiere a una secuencia de ácido nucleico donde se inicia la replicación y que se deriva de una fuente no de mamífero. Esto permite que los vectores de ácido nucleico de la invención se repliquen y segreguen de manera estable junto con cromosomas endógenos en una célula huésped adecuada (por ejemplo, una célula microbiana, tal como una célula bacteriana o de levadura) de tal manera que sea transmisible a la progenie de célula huésped, excepto cuando la célula huésped es una célula huésped de mamífero. En células huésped de mamífero, los vectores de ácido nucleico con orígenes de replicación no de mamífero se integrarán en los cromosomas endógenos de la célula huésped de mamífero o se perderán después de la replicación de célula huésped de mamífero. Por ejemplo, los vectores de ácido nucleico con orígenes de replicación no de mamífero tales como cromosomas artificiales bacterianos (BAC), cromosoma artificial derivado de P1 (PAC), cósmidos o fósvidos, son capaces de replicarse y segregarse de manera estable junto con cromosomas endógenos en células bacterianas (tales como *E. coli*), sin embargo, si se introducen en células huésped de mamífero, el BAC, PAC, cósmido o fósvido o bien se integrarán o bien se perderán después de la replicación de células huésped de mamífero. Los cromosomas artificiales de levadura (YAC) son capaces de replicarse y segregarse de manera estable junto con cromosomas endógenos en células de levadura, sin embargo, si se introducen en células huésped de mamífero, el YAC o bien se integrará o bien se perderá después de la replicación de células huésped de mamífero. Por lo tanto, en este contexto, los vectores de ácido nucleico de la invención actúan como depósitos de ADN (es decir, para los genes esenciales para la producción retroviral) que se pueden transferir fácilmente a células de mamífero para generar líneas celulares estables para la producción retroviral. Los ejemplos de orígenes de

replicación no de mamífero incluyen orígenes de replicación bacterianos, tales como *oriC*, *oriV* u *oriS*, u orígenes de replicación de levadura, también conocidos como secuencias de replicación autónoma (elementos de ARS).

5 Los vectores de ácido nucleico de la presente invención comprenden un origen de replicación no de mamífero y son capaces de contener al menos 25 kilobases (kb) de ADN. En una realización, el vector de ácido nucleico tiene la capacidad de contener al menos 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340 o 350 kb de ADN. Se entenderá que las referencias a "capacidad de contener" tienen su significado habitual e implican que el límite superior para el tamaño del inserto para el vector de ácido nucleico no es menor que el tamaño reivindicado (es decir, no menos de 25 kb de ADN).

10 El objetivo de la presente invención es incluir los genes esenciales para el empaquetamiento retroviral en un constructo individual (es decir, el vector de ácido nucleico). Por lo tanto, los vectores de ácido nucleico de la invención deben ser capaces de contener insertos grandes de ADN. Para evitar dudas, se entenderá que las referencias a "vectores de ácido nucleico" o "cromosomas artificiales" no se refieren a plásmidos bacterianos naturales (por ejemplo, tales como los plásmidos actualmente utilizados en métodos de transfección transitoria) debido a que estos no son capaces de contener al menos 25 kb de ADN. El inserto de tamaño máximo que puede contener un plásmido es de aproximadamente 15 kb. Estos vectores de ácido nucleico tampoco se refieren a bacteriófagos que en general sólo contienen insertos máximos de 5-11 kb. Por lo tanto, en una realización, el vector de ácido nucleico de la invención no es un plásmido, bacteriófago o episoma.

15 El término "cromosomas endógenos" se refiere a cromosomas genómicos encontrados en la célula huésped antes de la generación o introducción de un vector de ácido nucleico exógeno, tal como un cromosoma artificial bacteriano.

20 25 Los términos "transfección", "transformación" y "transducción", como se usan en la presente, se pueden usar para describir la inserción del vector viral o no de mamífero en una célula diana. La inserción de un vector se denomina usualmente transformación para células bacterianas y transfección para células eucariotas, aunque la inserción de un vector viral también se puede denominar transducción. El experto en la técnica será consciente de los diferentes métodos de transfección no viral comúnmente utilizados, que incluyen, pero no se limitan a, el uso de métodos 30 físicos (por ejemplo electroporación, exprimido de células, sonoporación, transfección óptica, fusión de protoplastos, impalefección, magnetofección, pistola de genes o bombardeo de partículas), reactivos químicos (por ejemplo, fosfato de calcio, compuestos orgánicos altamente ramificados o polímeros catiónicos) o lípidos catiónicos (por ejemplo, lipofección). Muchos métodos de transfección requieren el contacto de soluciones de ADN de plásmido con las células, que entonces se cultivan y seleccionan para detectar una expresión génica de marcador.

35 40 El término "promotor" se refiere a una secuencia que impulsa la expresión génica. A fin de impulsar un alto nivel de expresión, puede ser beneficioso usar un promotor de alta eficiencia, tal como un promotor de alta eficiencia no retroviral. Los ejemplos de promotores adecuados pueden incluir un promotor tal como el promotor temprano inmediato de citomegalovirus humano (CMV), promotor de virus formador de foco de bazo (SFFV), promotor de virus de sarcoma de Rous (VSR) o promotor de factor de elongación humano 1-alfa (pEF).

45 50 Se puede usar un operón Tet (activación transcripcional controlada por tetraciclina) en un método de expresión génica inducible, en donde la transcripción se activa o desactiva de manera reversible en presencia del antibiótico tetraciclina o uno de sus derivados (por ejemplo, doxiciclina). En la naturaleza, el promotor P<sub>Tet</sub> expresa TetR, el represor, y TetA, la proteína que bombea antibiótico tetraciclina fuera de la célula. En la presente invención, el operón Tet puede estar presente o ausente, por ejemplo, en una realización, el operón Tet puede estar presente en el promotor.

55 60 El término "marcador seleccionable" se refiere a un gen que ayudará a seleccionar células que expresan activamente un gen insertado (por ejemplo, un transgén). Los ejemplos de marcadores de selección adecuados incluyen enzimas que codifican para resistencia a un antibiótico (es decir, un gen de resistencia a antibióticos), por ejemplo, kanamicina, neomicina, puromicina, higromicina, blasticidina o zeocina. Otro ejemplo de marcadores de selección adecuados son proteínas fluorescentes, por ejemplo, proteína fluorescente verde (GFP), proteína fluorescente roja (RFP) o proteína fluorescente azul (BFP).

65 70 El término "señal de poliA" se refiere a una secuencia de señal de poliadenilación, por ejemplo, colocada en 3' de un transgén, que permite que los factores de huésped añadan una cola de poliadenosina (polyA) al extremo del ARNm naciente durante la transcripción. La cola de polyA es un tramo de hasta 300 ribonucleótidos de adenosina que protege el ARNm de la degradación enzimática y también ayuda en la traducción. Por consiguiente, los vectores de ácido nucleico de la presente invención pueden incluir una secuencia de señal de polyA, tal como las señales de polyA de beta globina humana o de beta globina de conejo, las señales de polyA temprana o tardía de virus de simio 40 (VS40), la señal de polyA de insulina humana, o la señal de polyA de hormona de crecimiento bovino. En una realización, la secuencia de señal de polyA es la señal de polyA de beta globina humana.

El término "secuencia de intrones" se refiere a una secuencia de nucleótidos que se retira del producto génico final por empalme de ARN. Se ha mostrado que el uso de un intrón en dirección 3' de la región de potenciador/promotor y en dirección 5' del inserto de ADNc incrementa el nivel de expresión génica. El incremento en la expresión depende del inserto de ADNc particular. Por consiguiente, el vector de ácido nucleico de la presente invención puede incluir

5 intrones tales como intrón de beta globina humana, intrón II de beta globina de conejo o un intrón químico de beta globina humana-inmunoglobulina. En una realización, el intrón es un intrón de beta globina humana y/o un intrón II de beta globina de conejo.

10 El término "línea celular de empaquetamiento" se refiere a una línea celular con proteína gag y pol insertadas de manera estable y genes de glicoproteína de envoltura. Alternativamente, el término "línea celular productora" se refiere a una línea celular de empaquetamiento con un vector de transferencia insertado de manera estable que contiene un transgén de interés. Un experto en la técnica entenderá que los vectores de ácido nucleico descritos en la presente se pueden utilizar para generar líneas celulares de empaquetamiento (es decir, cuando al menos los genes *gag*, *pol* y *env* están presentes en el vector de ácido nucleico e incorporados en una célula huésped) o líneas celulares productoras (es decir, cuando el vector de ácido nucleico comprende adicionalmente los componentes del vector de transferencia que se incorporarán en una célula huésped junto con los genes *gag*, *pol* y *env*).

15 El término "transfectado de manera estable" se refiere a líneas celulares que son capaces de pasar genes retrovirales introducidos a su progenie (es decir, células hijas), ya sea debido a que el ADN transfundido se ha incorporado en los cromosomas endógenos o mediante herencia estable de cromosomas exógenos.

#### Vectores de ácido nucleico

20 De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona un vector de ácido nucleico que comprende un origen de replicación no de mamífero, uno o una pluralidad de sitios de recombinación y la capacidad de contener al menos 25 kilobases (kb) de ADN seleccionado de: un cromosoma artificial bacteriano (BAC), un cromosoma artificial de levadura (YAC), un cromosoma artificial derivado de P1, un fósido o un cósmido, que comprende secuencias de ácidos nucleicos retrovirales que codifican para:

25 30 proteínas de gag y pol, y

una proteína de env retroviral,

35 35 en donde cada una de las secuencias de ácido nucleico retroviral tiene su propio promotor dentro del vector de ácido nucleico.

40 Los métodos actuales para generar vectores retrovirales implican la transfección transitoria de los genes retrovirales en una célula huésped. Sin embargo, se han asociado muchas desventajas con este método debido a que es costoso, laborioso y difícil de aumentar. Una solución sería modificar una línea celular de empaquetamiento que incorpore de manera estable los genes de empaquetamiento retroviral para evitar los problemas asociados con la transfección transitoria y para reducir la salida de vector retroviral variable.

45 Los presentes inventores han encontrado que los vectores de ácido nucleico descritos en la presente se pueden utilizar para generar una línea celular de empaquetamiento retroviral que mejora las dificultades previas asociadas con los métodos de producción de vectores retrovirales. Por ejemplo, los métodos conocidos para producir líneas celulares de empaquetamiento retroviral implican múltiples rondas de selección después de que se introduce cada gen retroviral. Este proceso puede tardar hasta seis meses y requiere mucha mano de obra. Al incluir todos los genes retrovirales en el vector de ácido nucleico, entonces los genes retrovirales se pueden insertar en los cromosomas endógenos de una célula huésped de mamífero en una única etapa. Por lo tanto, el uso de un vector 50 de ácido nucleico, como se propone en la presente, reducirá la presión de selección, reducirá el período de tiempo de silenciamiento y permitirá una examinación más rápida de células de empaquetamiento potenciales. Además, todos los genes retrovirales incluidos en el vector de ácido nucleico se integrarán en los cromosomas endógenos de la célula huésped de mamífero en un locus individual, lo que reducirá el riesgo de que los genes retrovirales individuales se silencien y garantizará que todos los genes retrovirales se expresen uniformemente.

55 55 En una realización, el vector de ácido nucleico comprende adicionalmente secuencias de ácido nucleico que codifican para el genoma de ARN de una partícula de vector retroviral. Se entenderá que el genoma de ARN de la partícula de vector retroviral usualmente se incluye en el "vector de transferencia" utilizado en métodos de transfección transitoria. El plásmido de vector de transferencia en general contiene un promotor (tal como CMV), la LTR de 3' (que puede o puede no ser una LTR de 3' de autoinactivación (es decir, SIN)), la LTR de 5' (que puede o puede no contener la región de U5), la secuencia de encapsidación ( $\psi$ ) y potencialmente el transgén unido a un promotor.

En una realización, se incluyen múltiples copias del genoma de ARN de la partícula de vector retroviral (es decir, el

vector de transferencia) en el vector de ácido nucleico. Se espera que múltiples copias del vector de transferencia den por resultado un título de vector viral más alto. Por ejemplo, el vector de ácido nucleico puede incluir dos o más, tal como tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez o más copias del genoma de ARN de la partícula de vector retroviral (es decir, el vector de transferencia).

5 En una realización, el vector de ácido nucleico contiene uno o una pluralidad de sitios de recombinación. Esto permite que las secuencias diana se integren en los cromosomas endógenos de la célula huésped de mamífero de una manera específica para el sitio en presencia de una enzima recombinasa. La enzima recombinasa cataliza la reacción de recombinación entre dos sitios de recombinación.

10 En la técnica se conocen muchos tipos de sistemas de recombinación específicos para el sitio, y cualquier sistema de recombinación adecuado se puede utilizar en la presente invención. Por ejemplo, en una realización, el/los sitio(s) de recombinación se selecciona(n) o deriva(n) del sistema de *int/att* del fago lambda, el sistema de *Cre/lox* del bacteriófago P1, el sistema de FLP/FRT de levadura, el sistema de recombinasa *Gin/gix* del fago Mu, el sistema de recombinasa Cin, el sistema de recombinasa Pin de *E. coli* y el sistema de R/RS del plásmido pSR1, o cualquier combinación de los mismos. En una realización adicional, el sitio de recombinación es un sitio *att* (por ejemplo, del fago lambda), en donde el sitio *att* permite la integración dirigida al sitio en presencia de una integrasa lambda. Se entenderá que la referencia a "integrasa lambda" incluye referencias a integrasas mutantes que aún son compatibles con el sistema de *int/att*, por ejemplo, las integrasas lambda modificadas descritas en el documento WO 2002/097059.

15 En una realización, el vector de ácido nucleico se selecciona de: un cromosoma artificial bacteriano (BAC), un cromosoma artificial de levadura (YAC), un cromosoma artificial derivado de P1 (PAC), fósrmido o un cósmido. En una realización adicional, el vector de ácido nucleico es un cromosoma artificial bacteriano (BAC).

20 *Cromosomas artificiales bacterianos*

25 El término "cromosoma artificial bacteriano" o "BAC" se refiere a un constructo de ADN derivado de plásmidos bacterianos que es capaz de contener un inserto grande de ADN exógeno. Usualmente, pueden contener un inserto de ADN máximo de aproximadamente 350 kb. Los BAC se desarrollaron a partir del plásmido de fertilidad funcional bacteriano bien caracterizado (plásmido F) que contiene genes de partición que promueven la distribución uniforme de plásmidos después de la división celular bacteriana. Esto permite que los BAC se repliquen y segreguen de manera estable junto con genomas bacterianos endógenos (tales como *E. coli*). El BAC usualmente contiene al menos una copia de un origen de replicación (tal como el gen *oriS* u *oriV*), el gen *repE* (para replicación de plásmido y regulación de número de copias) y genes de partición (tales como *sopA*, *sopB*, *parA*, *parB* y/o *parC*) lo que garantiza el mantenimiento estable del BAC en células bacterianas. Los BAC son naturalmente circulares y superenrollados, lo que los hace más fáciles de recuperar que los cromosomas artificiales lineales, tales como los YAC. También se pueden introducir en células huésped bacterianas de manera relativamente fácil, usando métodos simples tales como electroporación.

30 En una realización, el cromosoma artificial bacteriano comprende un gen *oriS*. En una realización, el cromosoma artificial bacteriano comprende un gen *repE*. En una realización, el cromosoma artificial bacteriano comprende genes de partición. En una realización adicional, los genes de partición se seleccionan de *sopA*, *sopB*, *parA*, *parB* y/o *parC*. En otra realización adicional, el cromosoma artificial bacteriano comprende un gen *sopA* y *sopB*.

35 40 45 50 55 El BAC para el uso en la presente invención se puede obtener de fuentes comerciales, por ejemplo, el pSMART BAC de LUCIGENT™ (véase el n.º de registro de genoma EU101022.1 para la secuencia de estructura principal completa). Este BAC contiene el sistema de "copia" de L-arabinosa que también contiene el origen de replicación de la copia del medio *oriV*, que está activo sólo en presencia de la proteína de replicación de TrfA. El gen para TrfA se puede incorporar en el genoma de células huésped bacterianas bajo el control del promotor inducible por L-arabinosa *araC-P<sub>BAD</sub>* (véase Wild *et al.* (2002) *Genome Res.* 12(9): 1434- 1444). La adición de L-arabinosa induce la expresión de TrfA, que activa *oriV*, lo que provoca que el plásmido se replique hasta 50 copias por célula.

55 *Cromosomas artificiales de levadura*

60 El término "cromosoma artificial de levadura" o "YAC" se refiere a cromosomas en los que el ADN de levadura se incorpora en plásmidos bacterianos. Contienen una secuencia de replicación autónoma (ARS) (es decir, un origen de replicación), un centrómero y telómeros. A diferencia de los BAC, el YAC es lineal y, por lo tanto, contiene telómeros de levadura en cada extremo del cromosoma para proteger los extremos de la degradación conforme se pasa a la progenie de célula huésped. Los YAC pueden contener un intervalo de tamaños de inserto de ADN; cualquiera de 100-2000 kb.

65 *Cromosomas artificiales derivados de P1*

El término "cromosoma artificial derivado de P1" o "PAC" se refiere a constructos de ADN derivados del ADN del bacteriófago P1 y el plásmido F bacteriano. Usualmente, pueden contener un inserto de ADN máximo de aproximadamente 100-300 kb y se utilizan como vectores de clonación en *E. coli*. Los PAC tienen ventajas similares a los BAC, tales como ser fáciles de purificar e introducir en células huésped bacterianas.

5

### *Cósvidos y fósvidos*

El término "cósido" se refiere a constructos de ADN derivados de plásmidos bacterianos que contienen adicionalmente sitios de cos derivados del bacteriófago lambda. Los cósvidos en general contienen un origen bacteriano de replicación (tal como *oriV*), un marcador de selección, un sitio de clonación y al menos un sitio de *cos*. Los cósvidos usualmente pueden aceptar un inserto de ADN máximo de 40-45 kb. Se ha mostrado que los cósvidos son más eficientes para infectar células de *E. coli* que los plásmidos bacterianos convencionales. El término "fósvidos" se refiere a vectores de ácido nucleico no de mamífero que son similares a los cósvidos, excepto que se basan en el plásmido F bacteriano. En particular, usan el origen de replicación del plásmido F y mecanismos de partición para permitir la clonación de fragmentos de ADN grandes. Los fósvidos usualmente pueden aceptar un inserto de ADN máximo de 40 kb.

10

### Retrovirus

20 Los retrovirus son una familia de virus que contienen un genoma de ARN de hebra individual pseudodiploide. Codifican para una transcriptasa inversa que produce ADN a partir del genoma de ARN que entonces se puede insertar en el ADN de célula huésped. La invención descrita en la presente se puede utilizar para producir partículas de vector retroviral de defectuosas en replicación. La partícula de vector retroviral de la presente invención se puede seleccionar de o derivar de cualquier retrovirus adecuado.

25

25 En una realización, la partícula de vector retroviral se deriva de, o se selecciona de, un lentivirus, alfa-retrovirus, gamma-retrovirus o retrovirus espumoso, tal como un lentivirus o gamma-retrovirus, en particular un lentivirus. En una realización adicional, la partícula de vector retroviral es un lentivirus seleccionado del grupo que consta de VIH-1, VIH-2, VIS, VIF, VAIIE y Visna. Los lentivirus son capaces de infectar células que no se dividen (es decir, quiescentes), lo que los hace vectores retrovirales atractivos para la terapia génica. En aún una realización adicional, la partícula de vector retroviral es VIH-1 o se deriva de VIH-1. Se puede encontrar en la técnica la estructura genómica de algunos retrovirus. Por ejemplo, los detalles sobre el VIH-1 se pueden encontrar en el NCBI Genbank (n.º de registro de genoma AF033819). El VIH-1 es uno de los retrovirus mejor entendidos y, por lo tanto, a menudo se usa como vector retroviral.

30

### *Genes retrovirales*

Las secuencias de ácido nucleico comunes para todos los retrovirus se pueden explicar en más detalle, como sigue:

40 Repeticiones terminales largas (LTR): la estructura básica de un genoma de retrovirus comprende una LTR de 5' y una LTR de 3', entre o dentro de las cuales se ubican los genes requeridos para la producción retroviral. Las LTR son necesarias para la integración y transcripción retroviral. También pueden actuar como secuencias de promotor para controlar la expresión de los genes retrovirales (es decir, son genes de acción *cis*). Las LTR se componen de tres subregiones designadas U3, R, U5: U3 se deriva de la secuencia única para el extremo de 3' del ARN; R se deriva de una secuencia repetida en ambos extremos del ARN; y U5 se deriva de la secuencia única para el extremo de 5' del ARN. Por lo tanto, en una realización, el vector de ácido nucleico comprende adicionalmente una LTR de 5' y 3'. En una realización adicional, la región U5 de la LTR de 5' se puede eliminar y reemplazar con una cola de poliA no de VIH-1 (véase Hanawa *et al.* (2002) *Mol. Ther.* 5(3): 242-51).

50 A fin de abordar los problemas de seguridad relacionados con la generación de virus competentes para la replicación, se ha desarrollado un vector de auto-inactivación (SIN) al eliminar una sección en la región U3 de la LTR de 3', que incluye la caja de TATA y los sitios de unión para los factores de transcripción Sp1 y NF- $\kappa$ B (véase Miyoshi *et al.* (1998) *J. Virol.* 72(10):8150-7). La eliminación se transfiere a la LTR de 5' después de la transcripción inversa y la integración en células infectadas, lo que da por resultado la inactivación transcripcional de la LTR. Esto se conoce como un sistema de vector basado en lentivirus de auto-inactivación que se puede incluir en la presente invención.

60  $\psi$ : la encapsidación de los ARN retrovirales se produce en virtud de una secuencia de  $\psi$  (psi) ubicada en el extremo de 5' del genoma retroviral. También es bien conocido en la técnica que las secuencias en dirección 3' de la secuencia de psi y que se extienden en la región de codificación de *gag* se implican en la producción eficiente de vector retroviral (véase Cui *et al.* (1999) *J. Virol.* 73(7): 6171-6176). En una realización, el vector de ácido nucleico comprende adicionalmente una secuencia de  $\psi$  (psi).

Sitio de unión a cebador (PBS): el genoma retroviral contiene un PBS que está presente después de la región U5 de

la LTR de 5'. Este sitio se une al cebador de ARNt requerido para el inicio de la transcripción inversa. En una realización, el vector de ácido nucleico comprende adicionalmente una secuencia de PBS.

5 PPT: los genomas retrovirales contienen tramos cortos de purinas, denominados tracts de polipurina (PPT), cerca del extremo 3' del genoma retroviral. Estos PPT funcionan como cebadores de ARN para la síntesis de ADN de hebra positiva durante la transcripción inversa. Los retrovirus complejos (tales como el VIH-1) contienen un segundo PPT ubicado más centralmente (es decir, un tracto de polipurina central (cPPT)) que proporciona un segundo sitio para el inicio de la síntesis de ADN. Se ha mostrado que los vectores retrovirales que codifican para un cPPT tienen 10 transducción y expresión transgénica potenciadas (véase Barry *et al.* (2001) *Hum. Gene Ther.* 12(9): 1103-8). En una realización, el vector de ácido nucleico comprende adicionalmente una secuencia de PPT de 3' y/o una secuencia de cPPT.

15 La estructura genómica de las regiones no de codificación descritas anteriormente es bien conocida por un experto en la técnica. Por ejemplo, se pueden encontrar detalles sobre la estructura genómica de las regiones no de codificación en VIH-1 en el NCBI Genbank con el n.º AF033819, o para HXB2 de VIH-1 (una cepa de referencia de VIH-1 comúnmente usada) con el n.º de registro de genoma K03455. En una realización, las regiones no de codificación se derivan de las secuencias disponibles en el n.º de registro de genoma K03455, por ejemplo, de los pares de bases 454-1126 (para R-U5-PBS-Gag), 7622-8479 (para RRE) o 7769-8146 (para RRE), 4781-4898 (para cPPT), 9015-9120 y 9521-9719 (para dNEF-PPT-sinU3-R-U5).

20 20 *Gag/pol:* la expresión de los genes *gag* y *pol* depende de un cambio de marco de traducción entre *gag* y *gag-pol*. Ambas son poliproteínas que se escinden durante la maduración. La matriz estructural principal, la cápside, y las proteínas de nucleocápside del vector retroviral se codifican por *gag*. El gen *pol* codifica para las enzimas retrovirales: i) transcriptasa inversa, esencial para la transcripción inversa del genoma de ARN retroviral a ADN de doble hebra, ii) integrasa, que permite la integración del genoma de ADN retroviral en un cromosoma de célula huésped, y iii) proteasa, que escinde la poliproteína sintetizada a fin de producir las proteínas maduras y funcionales del retrovirus. En una realización, la secuencia de ácido nucleico retroviral que codifica para las proteínas de *gag* y *pol* se deriva de la secuencia de HXB2 de VIH-1, que está disponible en el n.º de registro de genoma K03455, por ejemplo, de los pares de bases 790-5105.

30 30 *Env:* el gen *env* ("envoltura") codifica para los componentes de superficie y transmembrana de la envoltura retroviral (por ejemplo, glicoproteínas gp120 y gp41 del VIH-1) y participa en la fusión retroviral-membrana celular. A fin de ampliar el tropismo de tejido del vector retroviral, los vectores retrovirales descritos en la presente se pueden pseudotipificar con una proteína de envoltura de otro virus. La pseudotipificación se refiere al proceso por el cual la 35 gama de vectores retrovirales de la célula huésped, incluyendo vectores lentivirales, se puede expandir o alterar al cambiar las glicoproteínas (GP) en las partículas de vector retroviral (por ejemplo, usando GP obtenidas de o derivadas de otros virus envueltos o usando GP sintéticas/artificiales). La glicoproteína más comúnmente utilizada para la pseudotipificación de vectores retrovirales es la GP de virus de estomatitis vesicular (VSVg), debido a su amplio tropismo y alta estabilidad de partículas de vector. Sin embargo, se entenderá por el experto en la técnica 40 que se pueden usar otras glicoproteínas para la pseudotipificación (véase Cronin *et al.* (2005) *Curr. Gene Ther.* 5(4):387-398). La elección del virus usado para la pseudotipificación también puede depender del tipo de célula y/u órgano al que se va a dirigir debido a que se ha mostrado que algunos pseudotipos tienen preferencias de tipo de tejido.

45 45 En una realización, la proteína de *env* se obtiene o deriva de un virus seleccionado de un alfaretrovirus (por ejemplo, virus de la leucosis aviar [VLA]), betaretrovirus (por ejemplo, retrovirus ovino Jaagsiekte (JSRV)), gammaretrovirus [por ejemplo, virus de la leucemia murina de Moloney (VLM), virus de la leucemia del simio gibón (GALV), retrovirus endógeno felino (RD114)], deltaretrovirus (por ejemplo, virus linfotrófico T humano 1 (VLTH-1)), espumavirus (por ejemplo, virus espumoso humano) y lentivirus (por ejemplo, virus Maedi-visna (MW)).

50 50 Los genes estructurales descritos en la presente son comunes a todos los retrovirus. Se pueden encontrar genes auxiliares adicionales en diferentes tipos de retrovirus. Por ejemplo, los lentivirus, tales como el VIH-1, contienen seis genes auxiliares adicionales conocidos como *rev*, *vif*, *vpu*, *vpr*, *nef* y *tat*. Otros retrovirus pueden tener genes auxiliares que son análogos a los genes descritos en la presente, sin embargo, es posible que no siempre se les haya dado el mismo nombre que en la bibliografía. Referencias tales como Tomonaga and Mikami (1996) *J. Gen. Virol.* 77(Pt 8): 1611-1621 describen diversos genes auxiliares de retrovirus.

60 60 *Rev:* el gen auxiliar *rev* ("regulador de virión") codifica para una proteína auxiliar que se une al elemento de respuesta a Rev (RRE) y facilita la exportación de transcriptos retrovirales. El producto de proteína del gen permite que fragmentos de ARNm retroviral que contienen el elemento de respuesta a Rev (RRE) se exporten desde el núcleo al citoplasma. Se predice que la secuencia de RRE formará una estructura plegada compleja. Esta función particular de la *rev* refleja un acoplamiento estrecho de las etapas de empalme y exportación nuclear. En una realización, el vector de ácido nucleico comprende una secuencia de RRE. En una realización adicional, la secuencia de RRE se deriva de la secuencia de HXB2 de VIH-1, que está disponible en el n.º de registro de genoma

K03455, por ejemplo de los pares de bases 7622 a 8479, o 7769 a 8146, en particular los pares de bases 7622 a 8479.

5 Rev se une a RRE y facilita la exportación de transcriptos virales empalmados individualmente (*env*, *vif*, *vpr* y *vpu*) o no empalmados (*gag*, *pol* y ARN genómico), conduciendo de esta manera a eventos posteriores como la traducción y el empaquetamiento de genes (véase Suhasini y Reddy (2009) *Curr. HIV Res.* 7(1): 91-100). En una realización, el vector de ácido nucleico comprende adicionalmente el gen auxiliar *rev* o un gen análogo a este (es decir, de otros retrovirus o un sistema funcionalmente análogo). La inclusión del gen *rev* garantiza la exportación eficiente de transcriptos de ARN del genoma de vector retroviral desde el núcleo al citoplasma, especialmente si también se incluye un elemento de RRE en el transcripto que se va a transportar. En una realización adicional, el gen *rev* comprende al menos el 60% de identidad de secuencia, tal como al menos el 70% de identidad de secuencia a los pares de bases 970 a 1320 del n.º de registro de genoma M11840 (es decir, ADNc del clon 12 de VIH-1, el locus de HIVPCV12). En una realización alternativa, el gen *rev* comprende al menos el 60% de identidad de secuencia, tal como al menos el 70%, 80%, 90% o 100% de identidad de secuencia a los pares de bases 5970 a 6040 y 8379 a 15 8653 del n.º de registro de genoma K03455.1 (es decir, virus de inmunodeficiencia humana tipo 1, HXB2).

20 Se cree que los genes auxiliares desempeñan una función en la replicación retroviral y la patogénesis, por lo tanto, muchos sistemas de producción de vectores virales actuales no incluyen algunos de estos genes. La excepción es *rev*, que usualmente está presente, o se utiliza potencialmente un sistema análogo al sistema de *rev/RRE*. Por lo tanto, en una realización, las secuencias de ácido nucleico que codifican para uno o más de los genes auxiliares *vpr*, *vif*, *vpu*, *tat* y *nef*, o genes auxiliares análogos, se alteran de tal manera que estos genes auxiliares se retiran del genoma de ARN de la partícula de vector retroviral o son incapaces de codificar para proteínas auxiliares funcionales. En una realización adicional, al menos dos o más, tres o más, cuatro o más, o todos los genes auxiliares *vpr*, *vif*, *vpu*, *tat* y *nef*, o genes auxiliares análogos, se alteran de tal manera que estos genes auxiliares se retiran del genoma de ARN de la partícula de vector retroviral o son incapaces de codificar para proteínas auxiliares funcionales. La retirada del gen auxiliar funcional puede no requerir la retirada de todo el gen; la retirada de una parte del gen o la alteración del gen será suficiente.

30 35 Se entenderá que las secuencias de ácido nucleico que codifican para la partícula de vector retroviral defectuosa en replicación pueden ser las mismas que, o derivarse de, los genes tipo natural del retrovirus en el que se basa la partícula de vector retroviral, es decir, las secuencias pueden ser versiones alteradas genéticamente o de otra manera de secuencias contenidas en el virus tipo natural. Por lo tanto, los genes retrovirales incorporados en los vectores de ácido nucleico o genomas de células huésped, también se pueden referir a versiones optimizadas por codones de los genes tipo natural.

#### Componentes adicionales

40 Los vectores de ácido nucleico de la invención pueden comprender componentes adicionales. Estas características adicionales se pueden utilizar, por ejemplo, para ayudar a estabilizar los transcriptos para la traducción, incrementar el nivel de expresión génica y activar/desactivar la transcripción génica.

45 Las partículas de vector retroviral producidas por la invención se pueden utilizar en métodos de terapia génica. Por consiguiente, en una realización, el vector de ácido nucleico comprende adicionalmente uno o más transgenes. Este transgén puede ser un gen terapéuticamente activo que codifica para un producto génico que se puede utilizar para tratar o mejorar una enfermedad diana. El transgén puede codificar, por ejemplo, para un ARN antisentido, una ribozima, una proteína (por ejemplo, una proteína supresora de tumores), una toxina, un antígeno (que se puede usar para inducir anticuerpos o células T auxiliares o células T citotóxicas) o un anticuerpo (tal como un anticuerpo de cadena individual). En una realización, el transgén codifica para beta globina.

50 55 Se espera que múltiples copias del vector de transferencia que contiene el transgén den por resultado un título de vector retroviral más alto, por lo tanto, en una realización, el vector de ácido nucleico comprende múltiples copias del transgén, tal como dos o más, en particular tres o más, copias del transgén. En algunos casos, se requiere más de un producto génico para tratar una enfermedad, por lo tanto, en una realización adicional, el vector de ácido nucleico comprende adicionalmente dos o más, tal como tres o más, o cuatro o más, transgenes diferentes.

60 65 Las referencias en la presente a "transgén" se refieren a ADN heterólogo o extraño que no está presente o no se expresa suficientemente en la célula huésped de mamífero en la que se introduce. Esto puede incluir, por ejemplo, cuando un gen diana no se expresa correctamente en la célula huésped de mamífero, por lo tanto, se introduce una versión corregida del gen diana como el transgén. Por lo tanto, el transgén puede ser un gen de interés terapéutico potencial. El transgén se puede haber obtenido de otro tipo de célula, u otra especie, o preparado sintéticamente. Alternativamente, el transgén se puede haber obtenido de la célula huésped, pero unido operativamente a regiones reguladoras que son diferentes a aquellas presentes en el gen nativo. Alternativamente, el transgén puede ser un alelo o variante diferente de un gen presente en la célula huésped.

- El objetivo de la terapia génica es modificar el material genético de las células vivas con propósitos terapéuticos, e implica la inserción de un gen funcional en una célula para lograr un efecto terapéutico. El vector retroviral producido usando los vectores de ácido nucleico y células huésped descritos en la presente se puede usar para transfectar células diana e inducir la expresión del gen de interés terapéutico potencial. Por lo tanto, el vector retroviral se puede usar para el tratamiento de un sujeto mamífero, tal como un sujeto humano, que padece un estado que incluye, pero no se limita a, trastornos hereditarios, cáncer y ciertas infecciones virales.
- 5 En una realización, el vector de ácido nucleico comprende adicionalmente un elemento de regulación de transcripción. Por ejemplo, cualquiera de los elementos descritos en la presente se puede unir operativamente a un promotor de tal manera que se puede controlar la expresión. Los promotores a los que se hace referencia en la presente pueden incluir promotores conocidos, en su totalidad o en parte, que pueden estar actuando de manera constitutiva o inducibles, por ejemplo, en presencia de una proteína reguladora. En una realización, el vector de ácido nucleico comprende adicionalmente un promotor de alta eficiencia, tal como un promotor de CMV. Este promotor tiene la ventaja de promover un alto nivel de expresión de los elementos codificados en el vector de ácido nucleico no de mamífero. En una realización adicional, el promotor de CMV comprende una secuencia derivada de la cepa de citomegalovirus humano AD169. Esta secuencia está disponible en el n.º de registro de genoma X17403, por ejemplo, de los pares de bases 173731 a 174404.
- 10 En una realización, el promotor (tal como un promotor de CMV) comprende adicionalmente al menos un operón Tet. El sistema de operón Tet se puede utilizar para controlar la expresión de las secuencias retrovirales contenidas dentro del vector de ácido nucleico. Brevemente, la proteína represora Tet bloquea la expresión al unirse al sitio del operón Tet que se introduce en el promotor. Por lo tanto, cuando el represor de Tet se une al operón Tet, no hay expresión génica. Al añadir tetraciclina o doxiciclina, el represor de Tet se secuestra permitiendo la actividad de promotor, por lo tanto, la expresión génica se activa. Los sistemas de operón Tet están ampliamente disponibles, tales como el operón Tet utilizado en el vector de expresión de mamífero pcDNA<sup>TM</sup>4/TO disponible de Invitrogen.
- 15 En una realización, el vector de ácido nucleico comprende adicionalmente una proteína de represor de operón de resistencia a tetraciclina ("represor de Tet" o "TetR"). En una realización adicional, el represor de Tet se optimiza por codones.
- 20 En una realización, el vector de ácido nucleico comprende adicionalmente un aislante, tal como un aislante de cromatina. El término "aislante" se refiere a una secuencia genética que bloquea la interacción entre promotores y potenciadores. En una realización adicional, el aislante (tal como un aislante de cromatina) está presente entre cada una de las secuencias de ácido nucleico retroviral. Esto ayuda a prevenir la interferencia de promotor (es decir, donde el promotor de una unidad de transcripción deteriora la expresión de una unidad de transcripción adyacente) entre secuencias de ácido nucleico retroviral adyacentes. Se entenderá que si los aislantes están presentes en el vector de ácido nucleico entre cada una de las secuencias de ácido nucleico retroviral, entonces estos se pueden disponer como constructos de expresión individuales dentro del vector de ácido nucleico. Por ejemplo, cada secuencia que codifica para las secuencias de ácido nucleico retroviral tiene su propio promotor y/o una señal de intrón y/o poliA. En una realización, el aislante de cromatina tiene al menos el 90% de identidad de secuencia, por ejemplo, al menos el 95% de identidad de secuencia, a la secuencia de aislante HS4 de pollo (*Gallus gallus*) (por ejemplo, véase el n.º de registro de genoma U78775.2, pares de bases 1 a 1205).
- 25 En una realización, el vector de ácido nucleico comprende adicionalmente un marcador seleccionable. Esto permite que se seleccionen las células que han incorporado las secuencias de ácido nucleico que codifican para una partícula de vector retroviral defectuosa en replicación. En una realización adicional, el marcador seleccionable es un gen de resistencia a antibiótico, tal como un gen de resistencia a zeocina, kanamicina o puromicina, en particular un gen de resistencia a zeocina (*ZeoR*). En otra realización adicional, el gen de resistencia a zeocina se deriva del gen *ble* de *Streptallotheichus hindustans*, por ejemplo, véase el n.º de registro de genoma X52869.1 de los pares de bases 3 a 377.
- 30 En una realización, el vector de ácido nucleico comprende adicionalmente una señal de poliA. El uso de una señal de poliA tiene la ventaja de proteger el ARNm de la degradación enzimática y ayudar en la traducción. En una realización adicional, la señal de poliA se obtiene de o se deriva de VS40, hormona de crecimiento bovino y/o beta globina humana. En una realización, la señal de poliA se deriva de la señal de poliA temprana de VS40 (por ejemplo, véase el n.º de registro de genoma EF579804.1, pares de bases 2668 a 2538 de la hebra negativa). En una realización, la señal de poliA se deriva de la señal de poliA de beta globina humana (por ejemplo, véase el n.º de registro de genoma GU324922.1, pares de bases 3394 a 4162).
- 35 En una realización, el vector de ácido nucleico comprende adicionalmente una secuencia de intrón. Se conoce que el uso de un intrón en dirección 3' de la región de potenciador/promotor y en dirección 5' del inserto de ADNc (es decir, el transgén) incrementa el nivel de expresión del inserto. En una realización adicional, la secuencia de intrón es un intrón de beta globina humana o la secuencia de intrón II de beta globina de conejo. En una realización, el intrón de beta globina humana se deriva de la secuencia disponible en el n.º de registro de genoma KM504957.1

(por ejemplo, de los pares de bases 476 a 1393). En una realización, el intrón II de beta globina de conejo se deriva de la secuencia disponible en n.º de registro de genoma V00882.1 (por ejemplo, de los pares de bases 718 a 1290).

- 5 En una realización, el vector de ácido nucleico comprende adicionalmente un elemento regulador postranscripcional de virus de hepatitis de marmota (WPRE). Se ha mostrado que la presencia de WPRE potencia la expresión y, como tal, es probable que sea beneficiosa para lograr altos niveles de expresión. En una realización adicional, el WPRE se deriva de la secuencia disponible en el n.º de registro de genoma J04514.1 (por ejemplo, de los pares de bases 1093 a 1684).
- 10 En una realización, el vector de ácido nucleico comprende adicionalmente un sitio de entrada al ribosoma interno (IRES). Un IRES es un elemento de ARN estructurado que usualmente se encuentra en la región no traducida de 5' en dirección 3' de la caperuza en 5' (que se requiere para el ensamblaje del complejo de iniciación). El IRES se reconoce por los factores de iniciación de traducción, y permite la traducción independiente de caperuza. En una realización adicional, el IRES se deriva del genoma del virus de encefalomiocarditis (VEMC) (por ejemplo, véase el n.º de registro de genoma KF836387.1, pares de bases 151 a 724).
- 15 En una realización, el vector de ácido nucleico comprende adicionalmente un sitio de clonación múltiple (MCS). Un MCS es un segmento corto de ADN dentro del vector de ácido nucleico que contiene múltiples sitios de restricción (por ejemplo, 10, 15 o 20 sitios). Estos sitios usualmente se presentan sólo una vez dentro del vector de ácido nucleico para garantizar que la endonucleasa sólo corta en un sitio. Esto permite que los genes retrovirales se inserten fácilmente usando las endonucleasas apropiadas (es decir, enzimas de restricción).
- 20 Se entenderá por una persona experta en la técnica que los constructos se pueden disponer en cualquier orden dentro del vector de ácido nucleico. En una realización de ejemplo, el vector de ácido nucleico comprende el siguiente inserto: una secuencia de ácido nucleico retroviral que codifica para las proteínas de gag y pol, una secuencia de ácido nucleico retroviral que codifica para la proteína de env, una secuencia de ácido nucleico retroviral que codifica para el gen auxiliar rev (tal como una secuencia de rev optimizada por codones) o un gen análogo a la misma o un sistema funcionalmente análogo, una proteína de represor de operón de resistencia a tetraciclina (TetR), un sitio de entrada al ribosoma interno, y un marcador seleccionable (tal como un marcador de selección de resistencia a zeocina) (es decir, GagPol-Env-Rev-represor de Tet-IRES-marcador de resistencia a antibióticos-secuencia de BAC restante ("estructura de BAC")); tal como: GagPol-VSVg(tipo natural)-Rev (optimizado por codones)-represor de Tet-IRES-resistencia a zeocina-pSMARTBAC). En una realización adicional, un aislante (tal como un aislante de cromatina) está presente entre cada una de las secuencias de gagpol, env y rev. En una realización adicional, un promotor está presente antes de cada una de las secuencias de gagpol, env y rev. En aún una realización adicional, al menos una copia de la secuencia de vector de transferencia (es decir, que comprende secuencias de ácido nucleico que codifican para el genoma de ARN de una partícula de vector retroviral) está presente antes de la secuencia de gagpol.
- 25 En una realización, el vector de ácido nucleico comprende el siguiente inserto: un aislante (tal como un aislante de cromatina), un promotor (tal como un promotor de CMV que comprende opcionalmente una secuencia de operón Tet), un intrón (tal como un intrón de beta globina humana), una secuencia de ácido nucleico retroviral que codifica para las proteínas de gag y pol, un ácido nucleico retroviral que codifica para RRE, una señal de poliA (tal como una señal de poliA de beta globina humana), un aislante (tal como un aislante de cromatina), un promotor (tal como un promotor de CMV que comprende opcionalmente una secuencia de operón Tet), un intrón (tal como un intrón de beta globina humana), una secuencia de ácido nucleico retroviral que codifica para la proteína de env, una señal de poliA (tal como una señal de poliA de beta globina humana), un aislante (tal como un aislante de cromatina), un promotor (tal como un promotor de CMV que comprende opcionalmente una secuencia de operón Tet), una secuencia de ácido nucleico retroviral que codifica para el gen auxiliar rev o un gen análogo al mismo o un sistema funcionalmente análogo, una señal de poliA (tal como una señal de poliA de beta globina humana), un aislante (tal como un aislante de cromatina), un promotor (tal como un promotor de CMV), un intrón (tal como un intrón de beta globina de conejo), una proteína represora de operón de resistencia a tetraciclina (TetR), un sitio de entrada al ribosoma interno, un marcador seleccionable (tal como un marcador de selección de resistencia a zeocina), una señal de poliA y un sitio de clonación múltiple.
- 30 En una realización, el vector de ácido nucleico comprende el siguiente inserto: un aislante (tal como un aislante de cromatina), un promotor (tal como un promotor de CMV que comprende opcionalmente una secuencia de operón Tet), un intrón (tal como un intrón de beta globina humana), una secuencia de ácido nucleico retroviral que codifica para las proteínas de gag y pol, un ácido nucleico retroviral que codifica para RRE, una señal de poliA (tal como una señal de poliA de beta globina humana), un aislante (tal como un aislante de cromatina), un promotor (tal como un promotor de CMV que comprende opcionalmente una secuencia de operón Tet), una secuencia de ácido nucleico retroviral que codifica para la proteína de env, una señal de poliA (tal como una señal de poliA de beta globina humana), un aislante (tal como un aislante de cromatina), un promotor (tal como un promotor de CMV que comprende opcionalmente una secuencia de operón Tet), una secuencia de ácido nucleico retroviral que codifica para el gen auxiliar rev o un gen análogo al mismo o un sistema funcionalmente análogo, una señal de poliA (tal como una señal de poliA de beta globina humana), un aislante (tal como un aislante de cromatina), un promotor (tal como un promotor de CMV), un intrón (tal como un intrón de beta globina de conejo), una proteína represora de operón de resistencia a tetraciclina (TetR), un sitio de entrada al ribosoma interno, un marcador seleccionable (tal como un marcador de selección de resistencia a zeocina), una señal de poliA y un sitio de clonación múltiple.
- 35 En una realización, las secuencias de ácido nucleico se pueden introducir en el vector de ácido nucleico secuencialmente. Esto permite la selección después de cada integración para garantizar que todas las secuencias de ácido nucleico requeridas se integran exitosamente en el vector de ácido nucleico. Alternativamente, al menos dos o más de las secuencias de ácido nucleico se introducen en el vector de ácido nucleico simultáneamente.
- 40 En una realización, las secuencias de ácido nucleico se pueden introducir en el vector de ácido nucleico secuencialmente. Esto permite la selección después de cada integración para garantizar que todas las secuencias de ácido nucleico requeridas se integran exitosamente en el vector de ácido nucleico. Alternativamente, al menos dos o más de las secuencias de ácido nucleico se introducen en el vector de ácido nucleico simultáneamente.
- 45 En una realización, las secuencias de ácido nucleico se pueden introducir en el vector de ácido nucleico secuencialmente. Esto permite la selección después de cada integración para garantizar que todas las secuencias de ácido nucleico requeridas se integran exitosamente en el vector de ácido nucleico. Alternativamente, al menos dos o más de las secuencias de ácido nucleico se introducen en el vector de ácido nucleico simultáneamente.
- 50 En una realización, las secuencias de ácido nucleico se pueden introducir en el vector de ácido nucleico secuencialmente. Esto permite la selección después de cada integración para garantizar que todas las secuencias de ácido nucleico requeridas se integran exitosamente en el vector de ácido nucleico. Alternativamente, al menos dos o más de las secuencias de ácido nucleico se introducen en el vector de ácido nucleico simultáneamente.
- 55 En una realización, las secuencias de ácido nucleico se pueden introducir en el vector de ácido nucleico secuencialmente. Esto permite la selección después de cada integración para garantizar que todas las secuencias de ácido nucleico requeridas se integran exitosamente en el vector de ácido nucleico. Alternativamente, al menos dos o más de las secuencias de ácido nucleico se introducen en el vector de ácido nucleico simultáneamente.
- 60 Se entenderá que los genes adicionales descritos en la presente se pueden introducir en el vector de ácido nucleico por técnicas de clonación molecular convencionales conocidas en la técnica, por ejemplo, usando endonucleasas de restricción y técnicas de ligadura. Además, el vector de ácido nucleico, en particular BAC, PAC, fósvidos y/o cósvidos, se puede introducir en células huésped bacterianas (tales como células de *E. coli*, en particular la cepa DH10B de *E. coli*) por técnicas convencionales, tales como electroporación.

## Usos

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona el vector de ácido nucleico como se define en la presente para usarse en la producción de una línea celular productora o de empaquetamiento retroviral.

5 Los vectores de ácido nucleico descritos en la presente se pueden utilizar para crear una línea celular de empaquetamiento retroviral que simplificaría en gran medida la producción de vectores retroviraless. Se entenderá que si se incluye un transgén en el vector de ácido nucleico, entonces esto se usará para crear una línea celular productora.

10 Como se describe en la presente, sería útil desarrollar una línea celular de empaquetamiento retroviral (o productora) estable a fin de superar las dificultades asociadas con la transfección transitoria. Los vectores de ácido nucleico descritos en la presente se pueden utilizar para preparar estas líneas celulares de empaquetamiento debido a que son capaces de contener insertos de ADN grandes que contienen los genes esenciales requeridos para el 15 empaquetamiento retroviral que entonces se pueden integrar en el genoma endógeno de células huésped de mamífero en una etapa.

## Célula huésped

20 La presente memoria descriptiva describe una célula de empaquetamiento retroviral que comprende secuencias de ácidos nucleicos que codifican para:

proteínas de gag y pol; y

25 proteína de env o un sustituto funcional de la misma,

en donde todas estas secuencias de ácido nucleico están ubicadas en un locus individual dentro del genoma de célula de empaquetamiento retroviral.

30 La ventaja de incluir todos los genes retrovirales en un vector de ácido nucleico grande es que se pueden preparar en células microbianas (tales como células bacterianas o de levadura) en primer lugar, que son mucho más fáciles de manejar y manipular, antes de integrarse en células de mamífero en una única etapa. Esto alivia la presión de selección y reduce el período de tiempo de silenciamiento una vez que los genes retrovirales se han integrado en una célula huésped de mamífero. El rasgo característico de este método es que todos los genes retrovirales

35 requeridos para crear una línea celular de empaquetamiento están presentes en un locus individual en el genoma endógeno, en lugar de dispersarse aleatoriamente de principio a fin del genoma endógeno. Esto tiene la ventaja de producir una célula de empaquetamiento retroviral que expresa todos los genes retrovirales al mismo nivel debido a que están ubicados en el mismo locus, en comparación con los métodos anteriores donde los genes retrovirales se integran aleatoriamente de principio a fin del genoma endógeno lo que puede provocar niveles desiguales de 40 expresión.

45 La célula de empaquetamiento retroviral comprende adicionalmente secuencias de ácido nucleico que codifican para el genoma de ARN de la partícula de vector retroviral. Esto también se puede ubicar en el locus individual con las secuencias de ácido nucleico que codifican para las proteínas de gag y pol y la proteína de env o un sustituto funcional de la misma.

La presente memoria descriptiva describe una célula de productora retroviral que comprende secuencias de ácidos nucleicos que codifican para:

50 proteínas de gag y pol;

proteína de env o un sustituto funcional de la misma; y

el genoma de ARN de la partícula de vector retroviral,

55 en donde todas estas secuencias de ácido nucleico están ubicadas en un locus individual dentro del genoma de célula productora retroviral.

60 La célula de empaquetamiento retroviral puede ser una célula de mamífero. La célula de mamífero puede seleccionarse de una célula HEK 293, célula CHO, célula Jurkat, célula KS62, célula PerC6, célula HeLa, o un derivado o equivalente funcional de estas. La célula huésped de mamífero puede ser una célula HEK 293, o derivada de una célula HEK 293. Estas células pueden ser líneas celulares adherentes (es decir, crecen en una capa individual unida a una superficie) o líneas celulares adaptadas a la suspensión/no adherentes (es decir, crecen en suspensión en un medio de cultivo). La célula HEK 293 puede ser una célula HEK 293T. El término "célula HEK

293" se refiere a la línea celular 293 de riñón embrionario humano que se usa comúnmente en biotecnología. En particular, las células HEK 293T se utilizan comúnmente para la producción de diversos vectores retrovirales. Otros ejemplos de líneas celulares comercialmente disponibles adecuadas incluyen líneas celulares T-REX™ (Life Technologies).

5

## Métodos

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un método para producir una línea celular de empaquetamiento retroviral estable, que comprende:

10

(a) introducir un vector de ácido nucleico que comprende un origen de replicación no de mamífero, uno o una pluralidad de sitios de recombinación y la capacidad de contener al menos 25 kilobases (kb) de ADN seleccionado de: un cromosoma artificial bacteriano (BAC), un cromosoma artificial de levadura (YAC), un cromosoma artificial derivado de P1, un fósrmido o un cósmido, que comprende secuencias de ácidos nucleicos retrovirales que codifican para:

15

proteínas de gag y pol, y

20

una proteína de env retroviral en un cultivo de células huésped de mamífero; y

25

(b) seleccionar dentro del cultivo una célula huésped de mamífero que tiene las secuencias de ácido nucleico codificadas en el vector integradas en un cromosoma endógeno de la célula huésped de mamífero.

30

En una realización, la célula huésped de mamífero se selecciona de una célula HEK 293, célula HEK 6E, célula CHO, célula Jurkat, célula KS62, célula PerC6, célula HeLa o un derivado o equivalente funcional de estas. En una realización adicional, la célula huésped de mamífero es una célula HEK 293, o derivada de una célula HEK 293. Estas células pueden ser líneas celulares adherentes (es decir, crecen en una capa individual unida a una superficie) o líneas celulares adaptadas a la suspensión/no adherentes (es decir, crecen en suspensión en un medio de cultivo). En una realización adicional, la célula HEK 293 es una célula HEK 293T o una célula HEK 6E. Otros ejemplos de líneas celulares comercialmente disponibles adecuadas incluyen líneas celulares T-REX™ (Life Technologies).

35

El experto en la técnica será consciente de que la introducción del vector de ácido nucleico en la célula huésped se puede realizar usando métodos adecuados conocidos en la técnica, por ejemplo, la transfección mediada por lípidos, la microinyección, la fusión de células (tal como microcélulas), la electroporación o el bombardeo con microproyectiles. En una realización, el vector de ácido nucleico se introduce en la célula huésped por electroporación. Se entenderá que la elección del método a usar para introducir el vector de ácido nucleico se puede elegir dependiendo del tipo de célula huésped de mamífero usada.

40

Una vez dentro de la célula huésped de mamífero, el vector de ácido nucleico se integrará aleatoriamente en el genoma endógeno de la célula huésped de mamífero. Por lo tanto, el método comprende adicionalmente seleccionar la célula huésped de mamífero en la que se han integrado los ácidos nucleicos codificados en el vector de ácido nucleico (por ejemplo, usando un marcador de selección de resistencia a antibióticos, tal como un marcador de resistencia a zeocina).

45

El experto en la técnica será consciente de los métodos para fomentar la integración del vector de ácido nucleico, por ejemplo, linealizar el vector de ácido nucleico si es naturalmente circular (por ejemplo, BAC, PAC, cósmidos o fósrmidos). El vector de ácido nucleico puede comprender adicionalmente áreas de homología compartida con los cromosomas endógenos de la célula huésped de mamífero para guiar la integración a un sitio seleccionado dentro del genoma endógeno. Además, si los sitios de recombinación están presentes en el vector de ácido nucleico, estos se pueden utilizar para la recombinación dirigida. Por ejemplo, el vector de ácido nucleico puede contener un sitio de *loxP* que permite la integración dirigida cuando se combina con recombinasa Cre (es decir, usando el sistema de Cre/lox derivado de bacteriófago P1). De manera alternativa (o adicionalmente), el sitio de recombinación es un sitio de *att* (por ejemplo, del fago lambda), en donde el sitio de *att* permite la integración dirigida al sitio en presencia de una integrasa lambda. Esto permitirá que los genes retrovirales se dirijan a un locus dentro del genoma endógeno que permite una expresión alta y/o estable.

55

Otros métodos de integración dirigida se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, los métodos para inducir la escisión dirigida de ADN genómico se pueden utilizar para fomentar la recombinación dirigida en un locus cromosómico seleccionado. Estos métodos a menudo implican el uso de sistemas de escisión modificados para inducir una rotura de doble hebra (DSB) o una mella en el genoma endógeno para inducir la reparación de la rotura por procesos naturales tales como la unión de extremos no homólogos (NHEJ) o reparación usando una plantilla de reparación (es decir, reparación dirigida por homología o HDR).

La escisión se puede presentar a través del uso de nucleasas específicas tales como nucleasas de dedos de zinc

modificadas (ZFN), nucleasas efectoras de tipo activador de transcripción (TALEN), usando el sistema de CRISPR/Cas9 con un ARNcr/ARNtracr modificado ("ARN guía individual") para guiar la escisión específica, y/o usando nucleasas basadas en el sistema Argonaute (por ejemplo, de *T. thermophilus*, conocido como "TtAgo", véase Swarts *et al.* (2014) *Nature* 507(7491): 258-261). La escisión dirigida usando uno de estos sistemas de nucleasa se 5 puede aprovechar para insertar un ácido nucleico en una ubicación diana específica usando ya sea procesos mediados por HDR o NHEJ. Por lo tanto, en una realización, el método comprende adicionalmente integrar las secuencias de ácido nucleico codificadas en el vector de ácido nucleico en el genoma (es decir, un cromosoma endógeno) de la célula huésped de mamífero usando al menos una nucleasa, en donde la al menos una nucleasa escinde el genoma de la célula huésped de mamífero de tal manera que las secuencias de ácido nucleico se 10 integran en el genoma de la célula. En una realización adicional, la al menos una nucleasa se selecciona del grupo que consta de una nucleasa de dedos de zinc (ZFN), una nucleasa de TALE (TALEN), un sistema de nucleasa CRISPR/Cas y combinaciones de los mismos.

15 La línea celular obtenida utilizando los métodos definidos en la presente se puede utilizar para producir un título alto de vector retroviral.

20 Las referencias en la presente al término "título alto" se refieren a una cantidad efectiva de vector o partícula retroviral que es capaz de transducir una célula diana, tal como una célula de paciente. En una realización, un título alto está es superior a 10<sup>6</sup> TU/ml sin concentración (TU = unidades de transducción).

25 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un método para producir una partícula de vector retroviral defectuosa en replicación, que comprende:

30 (a) introducir un vector de ácido nucleico que comprende un origen de replicación no de mamífero, uno o una pluralidad de sitios de recombinación y la capacidad de contener al menos 25 kilobases (kb) de ADN seleccionado de: un cromosoma artificial bacteriano (BAC), un cromosoma artificial de levadura (YAC), un cromosoma artificial derivado de P1, un fósmido o un cósmido, que comprende secuencias de ácidos nucleicos retrovirales que codifican para:

35 proteínas de gag y pol, y  
una proteína de env retroviral,

40 en donde cada una de las secuencias de ácido nucleico retroviral tiene su propio promotor dentro del vector de ácido nucleico en un cultivo de células huésped de mamífero;

45 (b) seleccionar dentro del cultivo una célula huésped de mamífero que tiene las secuencias de ácido nucleico codificadas en el vector integradas en un cromosoma endógeno de la célula huésped de mamífero; y

50 (c) cultivar adicionalmente la célula huésped de mamífero en condiciones en las que se produce la partícula de vector retroviral defectuosa en replicación.

Como se describió anteriormente en la presente, en una realización, la célula huésped de mamífero se selecciona de una célula HEK 293, célula CHO, célula Jurkat, célula KS62, célula PerC6, célula HeLa o un derivado o equivalente funcional de estas. En una realización adicional, la célula huésped de mamífero es una célula HEK 293, o derivada de una célula HEK 293. Estas células pueden ser líneas celulares adherentes (es decir, crecen en una capa individual unida a una superficie) o líneas celulares adaptadas a la suspensión/no adherentes (es decir, crecen en suspensión en un medio de cultivo). En una realización adicional, la célula HEK 293 es una célula HEK 293T. Otros ejemplos de líneas celulares comercialmente disponibles adecuadas incluyen líneas celulares T REX™ (Life Technologies).

55 Se entenderá por el experto en la técnica que las condiciones usadas en el método descrito en la presente dependerán de la célula huésped usada. Las condiciones habituales, por ejemplo, el medio de cultivo o la temperatura que se va a usar, se conocen bien en la técnica. En una realización, el cultivo se realiza al incubar la célula huésped de mamífero en condiciones humidificadas. En una realización adicional, las condiciones humidificadas comprenden incubar las células transfectadas a 37°C al 5% de CO<sub>2</sub>. En una realización, el cultivo se realiza utilizando un medio de cultivo seleccionado de: medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que contiene suero fetal bovino (FBS) al 10% (vol/vol), medio UltraCULTURE™ libre de suero (Lonza, n.º de cat. 12-725F), o medio de expresión FreeStyle™ (Thermo Fisher, n.º de cat. 12338-018).

60 En una realización, el método comprende adicionalmente aislar la partícula de vector retroviral defectuosa en replicación. Por ejemplo, en una realización, el aislamiento se realiza usando un filtro. En una realización adicional, el filtro es una membrana de unión baja a proteína (por ejemplo, una membrana de unión baja a proteína de 0,22 µm o una membrana de unión baja a proteína de 0,45 µm), tal como membranas artificiales de polifluoruro de

vinilideno) (PVDF) o polietersulfona (PES).

Una vez dentro de la célula huésped de mamífero, los ácidos nucleicos retrovirales presentes en el vector de ácido nucleico se pueden integrar en un locus individual aleatorio dentro del genoma endógeno. La etapa de integración se 5 puede fomentar como se describió anteriormente en la presente, por ejemplo, usando linealización y/o áreas de homología compartida. Los sitios de recombinación también se pueden utilizar para la recombinación dirigida.

Si los genes diana se integran en los cromosomas endógenos con un marcador selectivo, tal como un gen de 10 resistencia a antibiótico, entonces el método puede comprender adicionalmente seleccionar las células huésped de mamífero en las que los ácidos nucleicos retrovirales se han integrado exitosamente.

Una vez aisladas, las partículas de vector retroviral se pueden concentrar para aplicaciones *in vivo*. Los métodos de concentración incluyen, por ejemplo, ultracentrifugación, precipitación o cromatografía de intercambio aniónico. La 15 ultracentrifugación es útil como un método rápido para la concentración de vectores retrovirales a una pequeña escala. Alternativamente, la cromatografía de intercambio aniónico (por ejemplo, usando cartuchos de membrana de intercambio aniónico Mustang Q) o la precipitación (por ejemplo, usando PEG 6000) son particularmente útiles para procesar grandes volúmenes de sobrenadantes de vectores lentivirales.

Ahora se describirá la invención en detalle adicional con referencia a los siguientes ejemplos no limitativos.

## 20 Ejemplos

### Ejemplo 1: guía de constructo

25 La figura 1 muestra una guía paso a paso para la construcción de BACpack-WTGP-277delU5 y BACpack-SYNGP-277delU5. Debido a los extremos compatibles de una digestión con XbaI y NheI, los genes de empaquetamiento lentiviral se cargaron progresivamente en el vector de BAC de pSmart. En el punto de adición de GagPol, se prepararon 2 constructos que contenían ya sea GagPol tipo natural (WTGP) o el GagPol optimizado por codones, SYNGP. A estos se les dio la nomenclatura de BACpack-WTGP y de BACpack-SYNGP respectivamente. Entonces 30 se cargó el casete de transferencia en ambos de estos constructos y así se generó BACpackWTGP-277delU5 y BACpackSYNGP-277delU5.

### Ejemplo 2: selección de una agrupación policlonal estable

35 Se generaron agrupaciones de transfectantes estables policlonales al transfectar la línea celular adherente, HEK293T, con BACpackSYNGP-277delU5 o BACpackWTGP-277delU5. Entonces se seleccionaron los eventos de integración exitosos con zeocina.

40 Para evaluar la capacidad de estas agrupaciones policlonales para generar vector lentiviral, las células se indujeron con doxiciclina (I) o se dejaron sin inducir (UI) y se compararon con células HEK293T no transfectadas.

45 Los resultados muestran el título en unidades de transducción (TU)/ml del sobrenadante de vector lentiviral recolectado de cada condición de transfección. Se puede ver a partir de los resultados de titulación en la figura 2 que las agrupaciones policlonales estables, generadas con ya sea BACpackSYNGP-277delU5 o BACpackWTGP-277delU5, son capaces de producir el vector lentiviral a concentraciones en la región de 10e7 TU/ml, lo cual es comparable al sistema de transfección transitoria actual.

50 Los resultados confirman que el vector de BAC individual que contiene todos los genes de empaquetamiento necesarios para la producción lentiviral puede generar líneas celulares capaces de producir vector lentiviral a un título adecuado.

### Ejemplo 3: generación de clones de suspensión de transfección estables

55 El propósito principal de generar líneas celulares productoras de vectores lentivirales utilizando la tecnología BAC es aplicar rápidamente nuevos avances a la plataforma. Es probable que estos avances incluyan la modificación de líneas celulares especializadas. Por ejemplo, es un estándar de la industria incrementar el rendimiento produciendo productos biológicos en células en suspensión ya que crecen hasta densidades mayores que las células adherentes. Sin embargo, el sistema actual de producción de vector lentiviral depende de altas tasas de transfección que son más difíciles de lograr en células en suspensión que en células HEK293T adherentes. Como la eficiencia de 60 transfección es menos preocupante cuando se genera una línea celular estable debido a la selección de integrantes exitosos, el constructo de BAC es una solución ideal para generar líneas celulares en suspensión productoras de vectores lentivirales.

Como se demostró previamente, el constructo de BAC es capaz de generar líneas celulares productoras de vectores

lentivirales a partir de células HEK293T adherentes. Para demostrar la flexibilidad de los constructos de BAC, se generaron líneas celulares transfectantes estables a partir de la línea celular en suspensión HEK293 6E. Las células HEK293 6E se transfectaron con el constructo de BAC, BACpackWTGP-277delU5, y entonces se seleccionaron con zeocina. Esto fue seguido por la clonación para generar líneas celulares clonales. Los resultados en la figura 3 muestran la señal de GFP generada por las líneas celulares estables. Esto indica tanto la presencia de resistencia a la zeocina como un casete de expresión de GFP funcional en el segmento de vector de transferencia.

Este resultado sugiere que el constructo de BAC es capaz de generar clones estables a partir de múltiples líneas celulares.

10 Ejemplo 4: inducción de lentivirus en los clones en suspensión

A fin de confirmar la capacidad de los clones en suspensión estables para producir vector lentiviral, se indujeron los clones 1, 14, 15 y 16 con 2 µg/ml de doxiciclina y se midió el sobrenadante para determinar el título viral por transducción de células HEK293T.

15 Los resultados en la figura 4 muestran el título en unidades de transducción (TU)/ml del sobrenadante de vector lentiviral recolectado de cada clon. Los resultados muestran claramente que las líneas celulares generadas por transfección estable de la línea celular en suspensión HEK293 6E con BACpackWTGP-277delU5 son capaces de producir vector lentiviral con rendimientos comparables al sistema de transfección transitoria actual.

20 Ejemplo 5: título de vector de clones

25 Los clones 1 y 16 como se describe en la figura 4 se sometieron a pase en cultivo y se indujeron y titularon en puntos de tiempo posteriores para determinar si la producción de vector era estable a partir de estos clones altamente productivos. Como se muestra en las figuras 5A y 5B, los títulos de vector de estos clones realmente incrementaron moderadamente entre el pase 5 y el pase 21, posiblemente debido a un incremento en la concentración de butirato de sodio introducida en el método de inducción.

30 Se entenderá que las realizaciones descritas en la presente se pueden aplicar a todos los aspectos de la invención.

## REIVINDICACIONES

1. Método para producir una línea celular de empaquetamiento retroviral estable, que comprende:
    - 5 (a) introducir un vector de ácido nucleico que comprende un origen de replicación no de mamífero, uno o una pluralidad de sitios de recombinación y la capacidad de contener al menos 25 kilobases (kb) de ADN seleccionado de: un cromosoma artificial bacteriano (BAC), un cromosoma artificial de levadura (YAC), un cromosoma artificial derivado de P1, un fósmodo o un cósmido, que comprende secuencias de ácidos nucleicos retrovirales que codifican para:
      - 10 proteínas de gag y pol, y
        - 15 una proteína de env retroviral,
- 15 en donde cada una de las secuencias de ácido nucleico retroviral tiene su propio promotor dentro del vector de ácido nucleico, en un cultivo de células huésped de mamífero; y
    - 20 (b) seleccionar dentro del cultivo una célula huésped de mamífero que tiene las secuencias de ácido nucleico codificadas en el vector integradas en un cromosoma endógeno de la célula huésped de mamífero.
- 20 2. Método según la reivindicación 1, en donde el vector de ácido nucleico comprende adicionalmente secuencias de ácido nucleico que codifican para el genoma de ARN de una partícula de vector retroviral.
  - 25 3. Método según las reivindicaciones 1 o 2, en donde el vector de ácido nucleico comprende adicionalmente el gen auxiliar rev.
  - 30 4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el vector de ácido nucleico es un BAC.
  - 35 5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la célula de mamífero es una célula HEK 293, célula CHO, célula Jurkat, célula KS62, célula PerC6, célula HeLa, o un derivado o equivalente funcional de estas.
  - 40 6. Método según la reivindicación 5, en donde la célula de mamífero es una célula adaptada a la suspensión/no adherente.
  - 45 7. Método para producir una partícula de vector retroviral defectuosa en replicación, que comprende:
    - 45 (a) introducir un vector de ácido nucleico que comprende un origen de replicación no de mamífero, uno o una pluralidad de sitios de recombinación y la capacidad de contener al menos 25 kilobases (kb) de ADN seleccionado de: un cromosoma artificial bacteriano (BAC), un cromosoma artificial de levadura (YAC), un cromosoma artificial derivado de P1, un fósmodo o un cósmido, que comprende secuencias de ácidos nucleicos retrovirales que codifican para:
      - 50 proteínas de gag y pol, y
        - 55 una proteína de env retroviral,
- 50 en donde cada una de las secuencias de ácido nucleico retroviral tiene su propio promotor dentro del vector de ácido nucleico, en un cultivo de células huésped de mamífero; y
    - 55 (b) seleccionar dentro del cultivo una célula huésped de mamífero que tiene las secuencias de ácido nucleico codificadas en el vector integradas en un cromosoma endógeno de la célula huésped de mamífero; y
      - 60 (c) cultivar adicionalmente la célula huésped de mamífero en condiciones en las que se produce la partícula de vector retroviral defectuosa en replicación.
- 60 8. Método según la reivindicación 7, que comprende adicionalmente aislar la partícula de vector retroviral defectuosa en replicación.
  - 65 9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde las secuencias de ácido nucleico retroviral se derivan de un retrovirus seleccionado de lentivirus, alfa-retrovirus, gamma-retrovirus y retrovirus espumoso.

10. Método según la reivindicación 9, en donde las secuencias de ácido nucleico retroviral se derivan de un lentivirus seleccionado del grupo que consta de VIH-1, VIH-2, VIS, VIF, VAIÉ y Visna.
- 5 11. Método según la reivindicación 10, en donde las secuencias de ácido nucleico retroviral se derivan de VIH-1.
12. Vector de ácido nucleico que comprende un origen de replicación no de mamífero, uno o una pluralidad de sitios de recombinación y la capacidad de contener al menos 25 kilobases (kb) de ADN seleccionado de: un cromosoma artificial bacteriano (BAC), un cromosoma artificial de levadura (YAC), un cromosoma artificial derivado de P1, un fósrmido o un cósmido, que comprende secuencias de ácidos nucleicos retrovirales que codifican para:
- 10 15. proteínas de gag y pol, y  
una proteína de env retroviral,  
en donde cada una de las secuencias de ácido nucleico retroviral tiene su propio promotor dentro del vector de ácido nucleico.
- 20 13. Vector de ácido nucleico según la reivindicación 12, que comprende adicionalmente secuencias de ácido nucleico que codifican para el genoma de ARN de una partícula de vector retroviral.
- 25 14. Vector de ácido nucleico según la reivindicación 12 o 13, que comprende adicionalmente el gen auxiliar rev.
15. Vector de ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, que es un BAC.

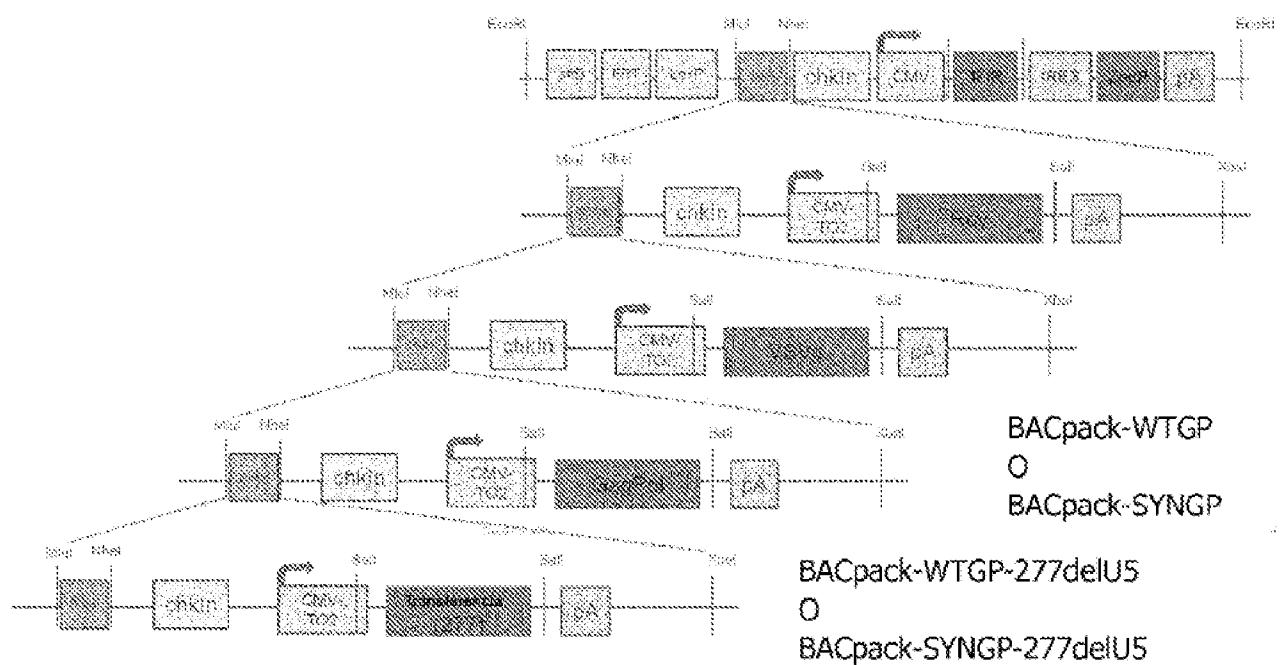


FIGURA 1

# ES 2 959 326 T3

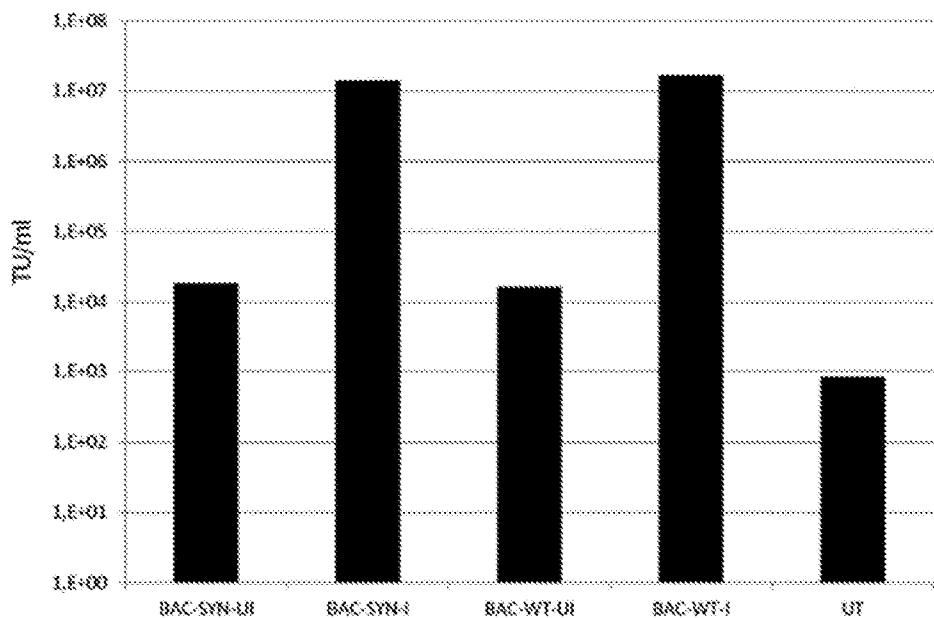


FIGURA 2

## Imágenes fluorescentes de GFP de célula estable

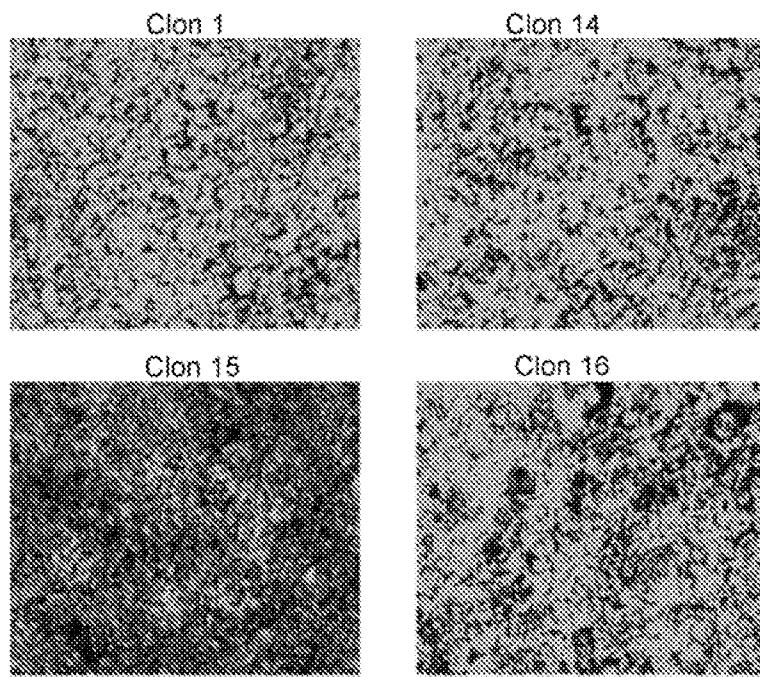


FIGURA 3

# ES 2 959 326 T3

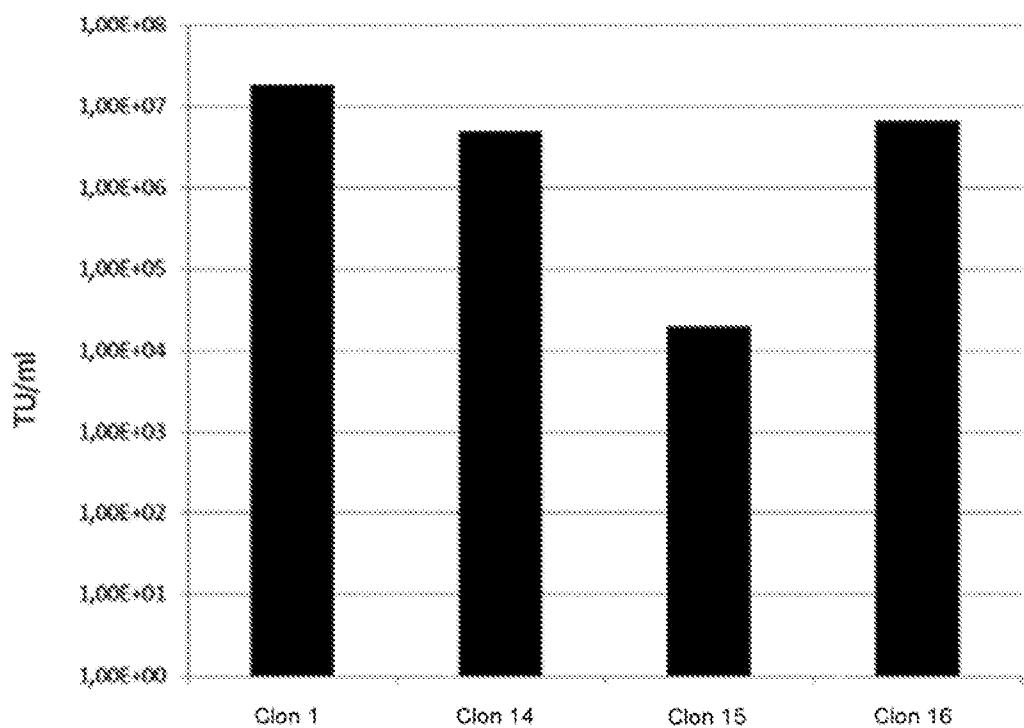


FIGURA 4

# ES 2 959 326 T3

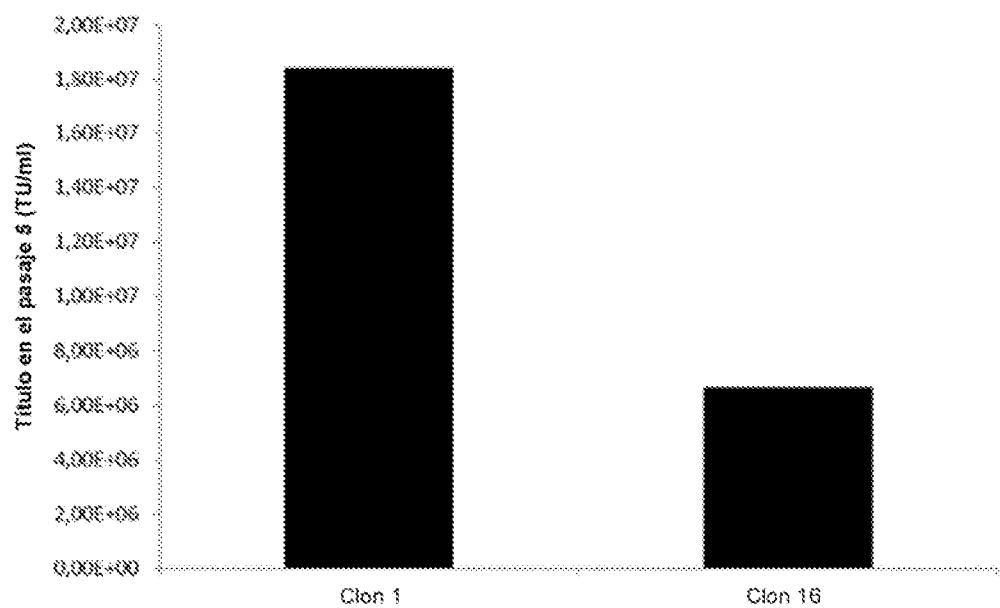


FIGURA 5A

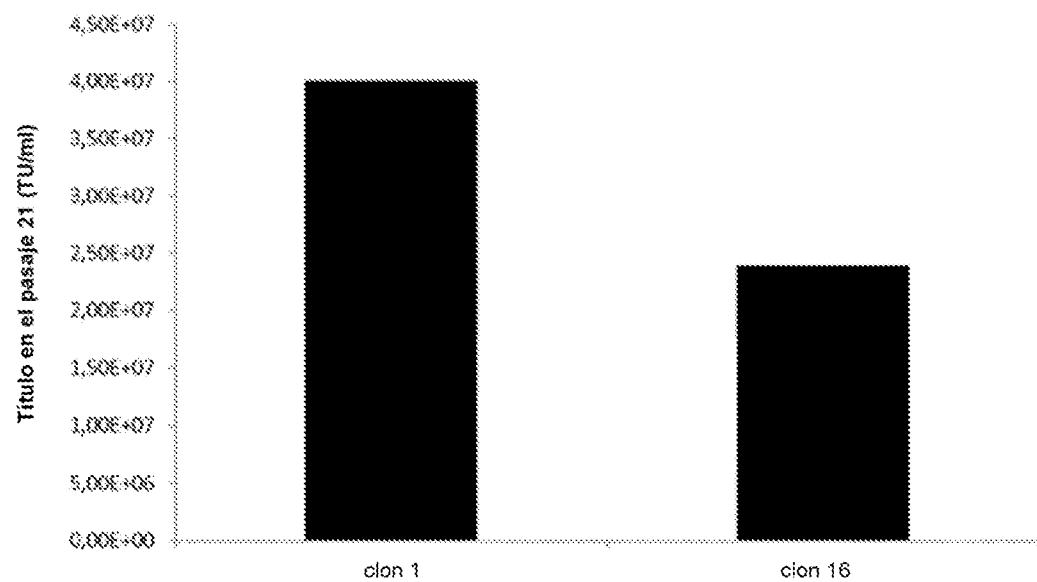


FIGURA 5B