



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 280 250**

51 Int. Cl.:
C12N 15/867 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 7/01 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00969534 .7**
86 Fecha de presentación : **10.10.2000**
87 Número de publicación de la solicitud: **1224314**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **24.07.2002**

54 Título: **ADN de triple hélice lentiviral, y vectores y células recombinantes que contienen ADN de triple hélice lentiviral.**

30 Prioridad: **12.10.1999 US 158387 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.09.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.09.2007

73 Titular/es: **INSTITUT PASTEUR**
25-28, rue du Docteur Roux
75724 Paris Cédex 15, FR
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA
RECHERCHE MEDICALE (INSERM)

72 Inventor/es: **Charneau, Pierre;**
Zennou, Véronique;
Pflumio, Françoise;
Sirven, Aude y
Dubart Kupperschmitt, Anne

74 Agente: **Urizar Anasagasti, Jesús María**

ES 2 280 250 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

ADN de triple hélice lentiviral, y vectores y células recombinantes que contienen ADN de triple hélice lentiviral.

5 **Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere al campo de la biotecnología, y especialmente a ácidos nucleicos virales y células que contienen ácidos nucleicos virales. Más particularmente, la presente invención se refiere a secuencias de ácido nucleico virales que pueden formar parte de estructuras de ADN de triple hélice así como de vectores de ácidos nucleicos, virus, y células que contienen estas secuencias de ácido nucleico virales. Se refiere además a métodos para usar dichas estructuras de ADN y secuencias de ácido nucleico.

15 **Descripción de la técnica relacionada**

La transferencia génica en células madre hematopoyéticas (CMH) tiene un gran potencial, tanto para la terapia génica de enfermedades congénitas así como adquiridas, y para el entendimiento de mecanismos que regulan la hematopoyesis normal y patológica. Puesto que las CMH tienen capacidades proliferativas amplias, la transferencia génica estable debe incluir la integración genómica del transgén. Los retrovirus basados en virus de leucemia murina Moloney (VLMMO) han sido muy populares debido a que se integran en los genomas de las células huésped y pueden permitir la expresión transgénica a largo plazo. Sin embargo, estos oncorretrovirus no se integran en células que no se dividen, y la mayoría de las CMH están inactivas. Se han desarrollado muchos protocolos de estimulación utilizando diferentes asociaciones de citocina para desencadenar el ciclo de las CMH con el fin de convertirlas en transducibles mediante vectores de transferencia de genes dependientes de mitosis derivados de oncovirus. Sin embargo, la estimulación de citocina induce que la diferenciación junto con la proliferación y potencialidades de las CMH puedan perderse durante el proceso de transducción. Este problema puede superarse mediante la utilización de vectores derivados de lentivirus puesto que se ha demostrado que los lentivirus infectan tanto a las células que se dividen como a las que no se dividen (Poznansky *et al.*, 1991; Naldini *et al.*, 1996). Informes iniciales publicados en los tres últimos años usando tales vectores derivados de lentivirus para la transducción de las CMH mostraron resultados prometedores pero muy heterogéneos (Case *et al.*, 1999; Evans *et al.*, 1999; Uchida *et al.*, 1998; Miyosi *et al.*, 1999).

Los lentivirus han desarrollado una estrategia de importación nuclear que permite a su genoma de ADN cruzar la membrana nuclear de una célula huésped. Esta importación nuclear activa de lentivirus explica su capacidad única, entre los retrovirus, para replicarse eficazmente en células diana que no se dividen, tales como macrófagos tisulares. La restricción de la replicación de oncovirus tales como VLMMO a células que se dividen parece deberse al requerimiento para la ruptura de la barrera de la membrana nuclear durante la mitosis, permitiendo a los complejos de preintegración (CPI) de VLMMO entrar en el núcleo (Roe *et al.*, 1993). La replicación de lentivirus independiente de mitosis, en el origen de su estrategia de replicación *in vivo* y por tanto de su patogenicidad, ha permitido también la generación de vectores de transferencia génica lentivirales con aplicaciones terapéuticas prometedoras (Poznansky *et al.*, 1991; Naldini *et al.*, 1996).

La replicación independiente de mitosis de lentivirus se demostró por primera vez mediante la infección productiva de células condroides no mitóticas mediante el lentivirus VISNA (Thormar, 1963). Pronto tras su descubrimiento, el VIH demostró replicarse en macrófagos primarios diferenciados (Gartner *et al.*, 1986; Ho *et al.*, 1986). El ADN del VIH se integra en la cromatina de células diana no mitóticas (Weinberg *et al.*, 1991; Lewis *et al.*, 1992), lo que implica que los CPI del VIH-1 pueden atravesar la membrana nuclear de las células huésped (Bukrinsky *et al.*, 1992). Así, la importación nuclear independiente de mitosis es un episodio fundamental responsable de la capacidad de los lentivirus para replicarse en células que no se dividen.

La búsqueda de determinantes virales responsables de la importación nuclear activa del genoma del ADN del VIH-1 ha constituido un campo de investigación activo pero controvertido. La presencia de supuestas señales de localización nucleares (NLS, nuclear localization signals) dentro de la matriz (MA) y proteínas virales Vpr ha conducido a la proposición de que podrían actuar de una manera redundante en la importación nuclear de ADN de VIH-1 (Burkinsky *et al.*, 1993b; Emerman *et al.*, 1994; Popov *et al.*, 1998; von Schwedler *et al.*, 1994). Se ha propuesto que la fosforilación de un pequeño subconjunto (1%) de moléculas de MA en un residuo de tirosina C-terminal activa la liberación de la membrana plasmática y su asociación con la proteína integrasa del VIH-1 (Gallay *et al.*, 1995a; 1995b). La contribución de estas proteínas a las propiedades cariofílicas de los CPI del VIH es actualmente un asunto de debate fuerte (Freed y Martin, 1994; Freed *et al.*, 1997; Koosra y Schuitemaker, 1999). Más recientemente, se han identificado motivos de NLS en la proteína integrasa (IN) y se han notificado mutaciones de estos motivos para suprimir la interacción de IN con carioferina α , un receptor de NLS celular (Gallay *et al.*, 1997).

Sumario de la invención

65 Sea cual sea el papel de estas proteínas virales candidatas en la importación nuclear del VIH, la presente invención muestra que el propio genoma de VIH-1 retrotranscrito lleva un determinante que actúa en cis para su importación nuclear.

ES 2 280 250 T3

La invención proporciona un ácido nucleico que comprende una estructura (de triple hélice) de triple cadena, tal como una de un lentivirus. La triple hélice estimula la entrada de ácidos nucleicos en el núcleo de las células. El ácido nucleico puede contener las secuencias que actúan en cis cPPT y CTS de un lentivirus. El lentivirus puede ser cualquier lentivirus, incluyendo, pero no limitados a, VIH-1, VIH-2, VISNA, VAIE, VIF, y AEC. En realizaciones, el ácido nucleico está en el contexto e un vector, tal como un vector de expresión.

Así, la invención también proporciona un vector, por ejemplo, un vector de ácidos nucleicos. El vector de ácidos nucleicos puede incluir secuencias de cualquier vector conocido por el experto en la técnica como útiles para la transferencia de ácidos nucleicos en células o para la expresión de ácidos nucleicos *in vitro*.

La invención proporciona además virus y células (eucariotas y procariotas) que contienen el ácido nucleico de la invención. Las células pueden ser células recombinantes.

La invención proporciona adicionalmente un método de transferencia de ácidos nucleicos a un núcleo de célula huésped, por ejemplo, exponiendo la célula huésped al ácido nucleico, vector, virus, o célula de la invención, para proporcionar una célula recombinante. Este método de la invención permite transferencia de alta eficacia de ácidos nucleicos al núcleo de la célula huésped, tal como el núcleo de una célula madre hematopoyética.

La transferencia de alta eficacia permite al experto en la técnica considerar el vector de expresión de la invención para su uso como un compuesto terapéutico, particularmente en la terapia génica. En general, la terapia génica puede usarse para tratar una enfermedad sanguínea, enfermedad del cerebro, enfermedad viral así como muchas otras enfermedades congénitas y adquiridas.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra que la iniciación central de la transcripción inversa es una etapa importante en el ciclo de replicación de VIH-1.

(A) Mutaciones introducidas en la secuencia cPPT del VIH-1. Se construyeron virus mutantes cPPT conservativos y semiconservativos. El mutante semiconservativo cPPT-D contiene 10 mutaciones en el cPPT 19-mero. El mutante cPPT-AG es su virus control en el que una única mutación purina a purina introduce el mismo cambio de aminoácidos en la región de codificación para la integrasa de solapamiento. Las mutaciones se muestran en el tipo inverso.

(B) Impacto de las mutaciones en cPPT sobre la infectividad de VIH-1. La cinética de replicación de virus en LSP estimulados con FHA (panel izquierdo) y células MT4 (panel derecho). Se infectaron las células con cantidades equivalentes de partículas virales según los contenidos de antígeno (p24) de la cápsida de sobrenadantes virales. La producción de virus fue seguida en el tiempo por actividad de la TI.

(C) Titulaciones de virus de ciclo único en células P4 tratadas con afidicolina que se dividen o que no se divide (HeLa CD4-LTR LacZ). Se midió la actividad de la β -galactosidasa utilizando un ensayo quimioluminiscente. Los resultados se expresan como unidades de luz relativas (ULR)/s/ng de p24 del inóculo, media \pm DE de cuatro experimentos independientes.

La figura 2 ilustra mutaciones en la cPPT que no afectan a la producción de virus, a la síntesis de ADN viral ni a la capacidad del ADN de integrarse *in vitro*.

(A) Efecto de mutaciones en la cPPT sobre la producción de virus. Se transfectaron células HeLa temporalmente con plásmidos pLAI, pcPPT-AG, o pcPPT-D. La producción de virus se midió mediante la cuantificación del antígeno viral p24 en sobrenadantes celulares, 48 horas tras la transfección.

(B) Efecto de mutaciones en la cPPT sobre la eficacia de la transcripción inversa. Se infectaron células P4 con las mismas cantidades de partículas virales (300 ng de antígeno p24 por cada 10^6 células) y se extrajo ADN 12 horas más tarde. Las cantidades totales de ADN viral transcrito inversamente, representado mediante un fragmento de VIH-1 *MscI* interno, se detectaron mediante inmunotransferencia tipo Southern utilizando el mismo fragmento de ADN como sonda y cuantificado usando un *phosphorimager*.

(C) Efecto de mutaciones en la cPPT sobre la integración *in vitro*. Se cocultivaron células MT4 con células H9-LAI o H9-cPPT-225 infectadas crónicamente. La integración *in vitro* de complejos de preintegración virales, aislados del citoplasma de células infectadas, se llevó a cabo tal como se describe anteriormente (Farnet y Haseltine, 1990). Se carga cada carril con ADN citoplasmático de 2×10^8 células infectadas.

La figura 3 muestra que los virus mutantes de ADN de triple hélice central carecen de importación nuclear de ADN viral.

(A) Estrategia para el seguimiento cuantitativo de las síntesis, circularización, e integración de ADN del VIH-1. Se extrajo el ADN de células infectadas en varios tiempos tras la infección, se digirieron con *MscI* y *XhoI*, y se analizaron mediante inmunotransferencia tipo Southern utilizando una sonda que solapa el sitio de *MscI* en 5'. El fragmento de ADN de 1,9 kb interno, común a todas las especies de ADN virales independientemente de su estado integrado

ES 2 280 250 T3

o no integrado, indica la cantidad total de ADN viral en células infectadas. Las señales de 2,6 kb, 2,8 kb, y 3,4 kb corresponden, respectivamente, a ADN lineal no integrado, se reveló ADN circular de uno, y dos LTR. Puesto que la sonda generada por PCR solapa exactamente el sitio *MscI*, la intensidad de cada banda es directamente proporcional a la cantidad de las especies de ADN virales correspondientes. Por tanto, puede calcularse la cantidad de ADN proviral integrado sustrayendo las señales de ADN viral circular y lineal integrado de la cantidad total de ADN viral.

(B) Análisis de inmunotransferencia tipo Southern de ADN viral que se procesa en células infectadas. Se infectaron células P4 con cantidades equivalentes de cada virus, normalizado en los contenidos de p24 de los sobrenadantes. Se lisaron las células infectadas a diferentes tiempos tras la infección, se extrajo ADN, y se usó para el análisis cuantitativo descrito anteriormente.

(C) Perfiles de ADN viral intracelular, al finalizar un ciclo de infección (48 horas tras la infección). Los resultados se expresan como porcentajes del ADN viral total. Se obtuvieron perfiles de ADN intracelular similares utilizando células MT4 (datos no mostrados).

La figura 4 muestra que el ADN lineal de los virus mutantes de triple hélice de ADN central se acumula en las proximidades de la membrana nuclear.

(A) Fraccionamiento de núcleo/citoplasma de células P4 infectadas. Análisis de inmunotransferencia tipo Southern de ADN viral de fracciones nucleares (N) y citoplasmáticas (C), 24 horas tras la infección. Se llevó a cabo el fraccionamiento basado en lisis con Triton tal como se describió anteriormente (Belgrader *et al.*, 1991). Se restringió el ADN con *MscI* y se hibridó usando la sonda de solapamiento del sitio de *MscI*.

(B) Detección de genomas de VIH-1 individuales mediante hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH, Fluorescente *In Situ* Hybridization). Se infectaron células P4 a alta multiplicidad (2 μ g de antígeno p24 por cada 10^6 células), y se hibridaron usando una sonda de genoma de VIH-1 de longitud completa. Se amplificaron las señales fluorescentes mediante precipitación de tiramida. Se analizaron secciones ópticas a través de células mediante microscopía de deconvolución.

La figura 5 muestra que la inserción de la triple hélice de ADN central en un vector basado en VIH-1 potencia la transducción de GFP y la importación nuclear del genoma de ADN del vector.

(A) Diagrama esquemático de genomas de vector. Se insertaron secuencias activas cis centrales cPPT y CTS del genoma de VIH-1, responsable de la formación de la triple hélice de ADN durante la transcripción inversa, en una posición central en el vector GFP de HR descrito previamente (Naldini *et al.*, 1996). TRIPinv-GFP incluye la secuencia de triple hélice de ADN central en la orientación inversa, no funcional.

(B) Eficacia comparativa de la transducción de GFP utilizando vectores de VIH con o sin una triple hélice de ADN central. Se usaron células HeLa que se dividen o que no se dividen (tratadas con afidicolina) como dianas. Se cuantificó la fluorescencia de GFP 48 horas tras la transducción usando un fluorómetro de microplacas (Wallac). Los resultados se expresan como la media \pm DE de un experimento representativo llevado a cabo por triplicado. Se sustrajo la actividad de pseudotransducción de GFP de la señal.

(C) Análisis de inmunotransferencia tipo Southern del ADN del vector que se procesa en células transducidas. Se lisaron células HeLa transducidas a tiempos diferentes tras la infección, se extrajo el ADN, se restringió y se realizó inmunotransferencia tipo Southern usando una estrategia similar a la de los virus. Se reemplaza la digestión de *MscI* por *EcoNI* y *Avall*, y la sonda es un fragmento de ADN de PCR que solapa exactamente al sitio de *EcoNI*.

(D) Análisis cuantitativo de la situación intracelular del ADN del vector, 48 horas tras la infección. Los resultados se presentan como porcentajes del ADN del vector total.

La figura 6 ilustra un modelo para la importación nuclear del genoma de VIH-1 dependiente de la triple hélice ADN.

(A) Visión general del fenotipo de virus mutantes de la triple hélice de ADN central observado. Las etapas de iniciación y terminación centrales de la transcripción inversa de VIH-1 generan una estructura "ADN flap" de cadena positiva larga: la triple hélice de ADN central. La cadena positiva de VIH-1 se sintetiza como dos segmentos medio genómicos discretos. Se inicia un segmento en sentido 3' en una copia central de la secuencia de tracto de polipurina (cPPT). El segmento en sentido 5' termina en sentido 3' de cPPT, tras un acontecimiento de desplazamiento de una cadena de 99 nucleótidos de longitud, bloqueado por una secuencia de terminación central (CTS, central termination sequence). Al finalizar un ciclo único de infección, el ADN viral de un virus natural se procesa casi completamente para convertirse en provirus integrado (\approx 55%); ADN circular de 1 LTR (\approx 35%) y 2 LTR ($<$ 5%); mientras que una pequeña fracción permanece como ADN lineal ($<$ 10%). Las mutaciones en la cPPT afectan a la formación de la triple hélice de ADN central. El producto de transcripción inversa final de un virus mutante de iniciación central es un ADN lineal de doble cadena continuo, que carece de la triple hélice de ADN central (Charneau *et al.*, 1992). El ADN viral de virus mutantes cPPT-D se acumula en células infectadas como moléculas de ADN lineal, y se localiza en la proximidad de la membrana nuclear.

(B) Dos mecanismos especulativos para la importación nuclear del genoma de VIH-1 dependiente de la triple hélice por medio de la maduración del complejo de transcripción inversa (CTI) en un complejo de preintegración (CPI) y translocación de ADN lineal a través del poro nuclear. La transcripción inversa de VIH-1 se produce probablemente dentro de un complejo (ordenado) estructurado rodeado de un conjunto de proteínas de cápsida. El tamaño de CTI supera el diámetro de exclusión del poro nuclear. Antes de la translocación, CTI experimenta una maduración a CPI más pequeños con pérdida de las proteínas de cápsida (Karageorgos *et al.*, 1993). La formación de la triple hélice de ADN señala el fin de la síntesis de ADN viral y puede señalar la salida de ADN de VIH del conjunto de la cápsida. En el CPI, se unen entre sí los extremos del ADN lineal probablemente tras la dimerización de las proteínas integrasas unidas a las puntas de los LTR (Miller *et al.*, 1997). Estando el ADN de triple hélice en una posición central, una estructura lógica para CPI de VIH-1 sería un filamento doble, plegado simétricamente en cada lado de la triple hélice central por la dimerización de integrasa. La triple hélice de ADN constituiría entonces un ápice que puede interactuar con proteínas lanzadera cariofilicas, permitiendo el paso del filamento de ADN de VIH-1 a través del poro nuclear. En virus mutantes cPPT, una falta de maduración de CTI en CPI inducirá una acumulación de cápsidas virales integrales en el poro nuclear. Alternativamente, la ausencia de la triple hélice de ADN en el ADN lineal mutante de cPPT impide la interacción con proteínas lanzadera prohibiendo la translocación del genoma de VIH-1 a través del poro nuclear. En ambos casos, el ADN de virus mutantes cPPT se acumulan como ADN lineal en la proximidad de la membrana nuclear.

La figura 7 muestra los resultados de los experimentos de transducción utilizando células CD34+ sanguíneas del cordón umbilical humano.

(A) Análisis FACS (“citometría de flujo”) de células CD34+ sanguíneas de cordón umbilical humano transducidas durante 24 horas en presencia de 100 ng/ml de P24 viral en las condiciones descritas en el presente documento. El análisis se llevó a cabo 48 horas tras lavar las células al final del periodo de transducción de 24 horas. Los porcentajes se expresan como proporciones de células hematopoyéticas sincronizadas morfológicamente. La media X indica el valor medio de intensidad de fluorescencia verde.

(B) Se analizó la expresión de GFP en el día 5 tras la transducción.

La figura 8 representa esquemáticamente el efecto de dosis viral en la eficacia de la transfección.

(A) El porcentaje de células CD34+ que expresan eGFP.

(B) El valor medio de la fluorescencia de GFP de células CD34+eGFP+.

(C) El valor medio de la intensidad de fluorescencia de GFP de células CD34+eGFP+ multiplicado por el porcentaje de células CD34+eGFP+. Se transdujeron células CD34+ durante 24 horas en las condiciones especificadas en el presente documento con el vector lentiviral incluyendo la secuencia de codificación para eGFP bajo el control del promotor CMV, e incluyendo (línea continua) o sin incluir (línea discontinua) la estructura de triple hélice. El análisis se llevó a cabo 48 horas tras lavar las células al final del periodo de transducción de 24 horas.

La figura 9 ilustra el análisis FACS de células CD34+ sanguíneas de cordón umbilical humano transducidas durante 24 horas en las condiciones descritas en el documento con un vector lentiviral que tiene un LTR de VIH-1 intacto (paneles izquierdos) o un LTR de VIH-1 con U3 delecionada (paneles derechos) y un promotor CMV interno (paneles superiores) o el promotor alfa EF-1 (paneles inferiores).

(A) Se llevó a cabo el análisis 48 horas tras el lavado de las células al final del periodo de transducción de 24 horas.

(B) Se llevó a cabo el análisis 120 horas tras el lavado de las células al final del periodo de transducción de 24 horas. El análisis diferencia entre células CD34 brillantes (inmaduras) y sin brillo.

Los porcentajes se expresan como proporciones de células hematopoyéticas sincronizadas morfológicamente. El segundo número, cuando se indica, representa la media de la fluorescencia verde.

Descripción detallada de la invención

Se ha demostrado previamente que el VIH-1 ha desarrollado una estrategia de transcripción inversa compleja, que difiere de la de los oncovirus por dos etapas que se producen en el centro del genoma: una iniciación adicional de síntesis de cadenas positivas acoplada a una etapa de terminación. Se sintetiza el ADN de cadena positiva de VIH-1 como dos segmentos medio genómicos diferenciados. Una copia adicional de las secuencia activa en cis de tracto de polipurina, presente en el centro de todos los genomas lentivirales (cPPT), inicia la síntesis de una cadena positiva en sentido 3' (Charneau *et al.*, 1991, 1992). El segmento de cadena positiva en sentido 5' iniciado en el PPT en 3', tras una transferencia de cadena, continuará hasta el centro del genoma y terminará tras un acontecimiento de desplazamiento diferenciado (figura 6A). El último acontecimiento por orden cronológico de la transcripción inversa de VIH-1 está controlado por la secuencia de terminación central (CTS) secuencia activa en cis, que expulsa la transcriptasa inversa (TI) de VIH-1 en este sitio en el contexto específico de síntesis de desplazamiento de cadenas (Charneau *et al.*, 1994; Lavigne *et al.*, 1997). Por tanto, el producto final de la transcripción inversa de VIH-1 es una molécula de ADN lineal que soporta en su centro un ADN flan estable de 99 nucleótidos de longitud, referido en el presente documento como la triple hélice de ADN central (figura 6A).

Los virus mutantes de iniciación y terminación centrales sintetizan ambos un producto de transcripción inversa que carece de la triple hélice de ADN natural. Tal como se ilustra en la figura 6A, en el caso de un mutante de iniciación central, el producto final es un ADN lineal de doble cadena continuo que carece de la triple hélice central (Charneau *et al.*, 1992). El segmento de cadena positiva en sentido 3' iniciado en cPPT no se sintetiza. Por tanto, no se produce desplazamiento de cadena en el centro del genoma; el alargamiento de la cadena positiva transferida avanza a lo largo de todo el genoma. En el caso de un mutante de terminación central, los acontecimientos de desplazamiento de cadena centrales ya no se controlan por la secuencia CTS mutada, y se generan solapamientos de cadena positiva distribuidos aleatoriamente, comparados con la triple hélice de ADN natural diferenciada (Charneau *et al.*, 1994). Mutaciones en la secuencias activas en cis cPPT o CTS perjudican gravemente la replicación de VIH, sugiriendo un papel directo de la triple hélice central en el ciclo de vida retroviral (Charneau *et al.*, 1992; Hungnes *et al.*, 1992; Charneau *et al.*, 1994).

La presente invención describe que la triple hélice de ADN central de VIH-1 está implicada en una etapa tardía de importación nuclear del genoma de VIH-1, inmediatamente antes de, o durante, la translocación de ADN viral a través del poro nuclear. Por tanto, las características distintivas de la transcripción inversa lentiviral explica, al menos en parte, la capacidad única de lentivirus, entre retrovirus, para replicarse en células que no se dividen. La invención también describe que los vectores de transferencia génica de VIH carecen de la triple hélice de ADN central muestran un defecto de importación nuclear fuerte. Esta invención establece que la inserción de las secuencias activas en cis centrales del genoma de VIH-1 en un vector VIH descrito anteriormente (Naldini *et al.*, 1996) aumenta la eficacia de la transducción complementando el defecto de importación nuclear de ADN del vector original a niveles naturales. Este hallazgo proporciona pruebas adicionales e independientes para el papel de la triple hélice de ADN central en importaciones nucleares VIH-1. La descripción de la triple hélice de ADN como determinante de importación nuclear de lentivirus tiene implicaciones importantes para el diseño de vectores lentivirales eficaces. Puesto que la infección por lentivirus de células diana que no se dividen se basa en su uso de una ruta de importación nuclear activa, es preferible mantener los determinantes de importación nuclear lentiviral en constructos de vector derivados. Constructos de vectores retrovirales clásicos son vectores de sustitución en los que las secuencias de codificación virales completas entre los LTR se delecionan y sustituyen por las secuencias de interés (Miller AD, 1997). En el caso de vectores lentivirales, esta estrategia clásica conduce a la delección de las secuencias activas en cis centrales cPPT y CTS. El papel importante de la triple hélice en la importación nuclear de VIH implica que tales constructos de vector de sustitución no son óptimos. Este hallazgo establece el hecho de que el determinante de importación nuclear de triple hélice de ADN es operativo en el contexto heterólogo de un vector lentiviral derivado de VIH-1. La triple hélice de ADN *per se*, fuera del contexto del genoma de VIH-1 nativo, puede estimular la importación nuclear de secuencias de ADN heterólogas (PCT Francia nº. 98 05197, 24 de abril de 1998). La presencia de la secuencia de triple hélice de ADN induce un aumento marcado de la eficacia de transducción génica en células madre hematopoyéticas.

Así, en un aspecto, la presente invención proporciona ácidos nucleicos (ADN o ARN, o análogos de los mismos) que pueden participar en estructuras de ácidos nucleicos de triple hélice (es decir, ácidos nucleicos de triple cadena). En realizaciones de la invención, los ácidos nucleicos son secuencias lentivirales. En realizaciones, los ácidos nucleicos se derivan de secuencias lentivirales, tal como por mutagénesis directa (es decir, delección deliberada, inserción, o sustitución de al menos un nucleótido) o mutagénesis de presión selectiva. Los ácidos nucleicos de la invención permiten una transferencia de alta eficacia de ácidos nucleicos en células huésped, y especialmente en núcleos de células huésped. Por esta capacidad, los genes que están funcional o físicamente unidos a los ácidos nucleicos de la invención pueden expresarse a niveles altos y/o en un alto porcentaje de células expuestas a los ácidos nucleicos. El ADN insertado en una región de triple cadena de un genoma antiviral según la presente invención es particularmente estable en el constructo, y ayuda a conseguir un nivel alto de transducción y transfección.

En una realización preferida, la invención proporciona una secuencia de ADN de tres cadenas inducida por las regiones cPPT y CTS de un lentivirus, que es capaz de inducir una alta tasa de entrada de ADN del vector en un núcleo de célula huésped, o que puede aumentar la tasa de importación nuclear del vector ADN. En realizaciones, la secuencia de ADN de tres cadenas puede unirse covalentemente a una secuencia de ácido nucleico heteróloga, tal como un gen indicador o gen de otro interés. Por ejemplo, el ácido nucleico de la invención puede comprender una secuencia de ácido nucleico heteróloga que codifica para un péptido, polipéptido, o proteína. En realizaciones, la secuencia de ácido nucleico heteróloga está presente dentro de la región de triple hélice. En realizaciones, la secuencia de ácido nucleico heteróloga está presente en el mismo ácido nucleico que la región de triple hélice, pero fuera de la triple hélice. En realizaciones, un único ácido nucleico comprende más de una secuencia de tres cadenas inducida por las regiones cPPT y CTS de un lentivirus.

En otro aspecto, la presente invención proporciona vectores, tales como vectores lanzadera, vectores de expresión, vectores de integración, transposones, retrotransposones, y similares, que contienen al menos una secuencia que puede participar en la formación de estructuras de ácidos nucleicos de triple hélice. En realizaciones, el vector comprende una única secuencia que puede participar en la formación de estructuras de ácidos nucleicos de triple hélice. En realizaciones, el vector comprende más de una secuencia que puede participar en la formación de estructuras de ácidos nucleicos de triple hélice. Los vectores pueden usarse para transferir los ácidos nucleicos de la invención de una célula a otra, para ayudar en la generación de grandes cantidades de ácidos nucleicos de la invención, y para servir como una molécula base en la que pueden insertarse otras secuencias de ácido nucleico de interés (por ejemplo, genes indicadores, genes terapéuticos).

ES 2 280 250 T3

En aún otro aspecto, la presente invención proporciona un método para infectar, transfectar, o transducir células eficazmente con una secuencia de ácido nucleico viral que comprende al menos una secuencia que puede participar en estructuras de ácidos nucleicos de triple hélice, en realizaciones, el método comprende la exposición de una célula, o una pluralidad de células, a al menos una copia de un ácido nucleico, vector, virus, o célula de la invención. En realizaciones, la etapa de exponer a la célula o células al ácido nucleico, vector, virus, o célula de la invención se lleva a cabo en condiciones tales que el ácido nucleico, vector, virus o célula de la invención puede introducirse en la célula o células (huésped) diana. En realizaciones preferidas, las condiciones son tales que altos niveles del ácido nucleico, vector, virus, o célula de la invención pueden introducirse en la célula o células diana.

En realizaciones, el método es sumamente eficiente, permitiendo la inserción del ácido nucleico de la invención en el núcleo del 30% o más de las células expuestas al ácido nucleico. En realizaciones, el porcentaje de núcleos que captan el ácido nucleico de la invención es del 40% o superior, por ejemplo, el 50% o superior, el 60% o superior, el 70% o superior, el 80% o superior, o el 90%-100%. En realizaciones preferidas, el porcentaje de núcleos que captan el ácido nucleico de la invención es superior al 80%, más preferiblemente, superior al 85%, y lo más preferiblemente, superior al 90%, tal como superior al 95%. En realizaciones, se infectan o se transfectan las células con virus completos (incluyendo fagos) o bacterias que contienen los ácidos nucleicos de la invención. En realizaciones, se introducen los ácidos nucleicos de la invención en las células usando medios mecánicos y/o químicos (por ejemplo, electroporación, fusión de liposomas). En realizaciones, el ácido nucleico desnudo según la invención se capta mediante las células huésped diana.

Así, en una realización, la invención proporciona el uso de una secuencia de nucleótidos que comprende las regiones cPPT y CTS, que adopta una estructura de ADN de tres cadenas (triple hélice) tras la transcripción inversa, en un vector lentiviral o retrotransposón y que estimula la entrada de, y la tasa de importación nuclear, el ADN del vector en el núcleo de la célula transducida.

En un aspecto de la invención, se proporcionan células recombinantes que contienen los ácidos nucleicos o vectores de la invención. Las células recombinantes pueden ser cualquier célula (eucariota o procariota), incluyendo una progenie o un derivado del mismo. Así, la invención incluye células que se crean usando una célula de la invención. En realizaciones, las células son eucariotas. En realizaciones, las células son células de mamíferos, tales como células HeLa o células hematopoyéticas, tales como células madre hematopoyéticas. Así, en realizaciones, la invención proporciona un procedimiento de transducir células eucariotas, en el que el procedimiento comprende el uso de una secuencia de ADN de tres cadenas, inducida por las regiones cPPT y CTS de un lentivirus, que puede introducir una alta tasa de entrada de ADN del vector en un núcleo de célula huésped, o que puede aumentar la tasa de importación nuclear de ADN del vector.

Debido a que las células recombinantes de la invención pueden expresar un gen heterólogo de interés a niveles altos, estas células pueden usarse en numerosas aplicaciones. Las aplicaciones incluyen, pero no se limitan a, la producción de altos niveles de proteínas de interés (tales como proteínas de valor terapéutico) en cultivos celulares.

En realizaciones, este aspecto de la invención proporciona un método para producir una proteína recombinante de interés exponiendo una célula diana a un ácido nucleico, vector, o virus de la invención y permitiendo a la célula diana captar el ácido nucleico de la invención, por ejemplo, a través de la transducción, transformación, o transfección. Tras la introducción del ácido nucleico en la célula diana, se cultiva la célula en condiciones en las que se expresa la proteína recombinante de interés, y por tanto producida por la célula diana, que se considera ahora una célula recombinante según la invención. Aunque el método puede practicarse en una célula única, individual, es evidente que el método será con frecuencia más práctico si se practica en una colección de células en las que todas las células son clones. Tal como se usa en el presente documento, "célula" se refiere a una célula individual o a una colección de células idénticas.

El método puede además incluir la purificación o el aislamiento de la proteína de interés a partir de la célula recombinante o fluido de cultivo celular. En un método de este tipo, pueden aplicarse los procedimientos de expresión y purificación de proteínas conocidos por los expertos en la técnica. Estos procedimientos son muy conocidos para los expertos en la técnica y por tanto no necesitan detallarse en este caso.

En una realización preferida, este aspecto de la invención proporciona un procedimiento para expresar un gen de interés *in vitro*, en el que el procedimiento comprende: a) exponer células diana a un ácido nucleico aislado o purificado que comprende un gen de interés y al menos una copia de las regiones que actúan en cis cPPT y CTS de un retrovirus, en el que las regiones cPPT y CTS incluyen una estructura de ADN de tres cadenas, en condiciones que permiten la captación del ácido nucleico en la célula diana para generar una célula recombinante, y b) cultivar la célula recombinante en condiciones que permiten que al menos parte del ácido nucleico se transfiera al núcleo de la célula recombinante y se exprese el gen de interés. En realizaciones, el procedimiento usa un vector según la invención. Así, la invención proporciona un método para expresar un gen de interés *in vitro*, por ejemplo, en un cultivo tisular. En realizaciones, el método comprende exponer células diana a un ácido nucleico, vector, virus, o célula de la invención en condiciones en las que la célula diana puede captar la molécula de la invención que contiene el gen de interés. Entonces se permite que la célula recombinante así fabricada crezca y se replique en condiciones en las que se expresa el gen de interés. En realizaciones, el método *in vitro* de expresión génica se acopla a un método de purificación o aislamiento de la proteína de interés. En estas realizaciones, la proteína de interés puede purificarse o aislarse a partir de otros componentes celulares usando técnicas conocidas por los expertos en la técnica, que incluyen,

ES 2 280 250 T3

pero no se limitan a, cromatografía líquida, precipitación, centrifugación, filtración en gel, y cromatografía de afinidad. Se conocen técnicas adecuadas por los expertos en la técnica y no necesitan detallarse en este caso.

La invención también se refiere a una célula recombinante de la invención para su uso en la expresión de un gen de interés, por ejemplo en un individuo que necesita la proteína expresada por el gen. Dicha célula recombinante puede fabricarse fuera del individuo exponiendo una célula huésped a un vector, virus o célula de la invención. En realizaciones preferidas, la célula recombinante es una célula madre hematopoyética. En realizaciones, las células recombinantes pueden purificarse o aislarse a partir de células no recombinantes en primer lugar, antes de su administración.

En otras realizaciones, se expone el individuo a un vector, y/o virus de la invención, en una cantidad y forma suficientes para dar como resultado la expresión del gen de interés dentro del cuerpo del individuo. La expresión del gen de interés se obtiene preferiblemente en una célula o tejido diana.

Además, la invención también se refiere a una expresión del vector de VIH-1 que comprende:

a) un ácido nucleico aislado o purificado que comprende al menos una copia de las regiones que actúan en cis cPPT y CTS de un retrovirus, en el que dichas regiones cPPT y CTS inducen una estructura de ADN de tres cadenas y

b) una secuencia de ácido nucleico heteróloga.

en la que el LTR de VIH-1 se deleciona por el promotor y el potenciador de U3, para su uso en el tratamiento de un individuo que padece, o que tiene una alta probabilidad de desarrollar, una enfermedad o trastorno que tiene una base genética, en el que dicho vector retroviral está en una cantidad suficiente para dar como resultado la expresión de dicha proteína terapéutica en una cantidad suficiente para tratar dicha enfermedad o trastorno.

La expresión del vector VIH-1 se usa en un tratamiento profiláctico, paliativo o curativo. El tratamiento puede concernir a un trastorno o enfermedad sanguínea, un trastorno o enfermedad del sistema nervioso o del cerebro, o una enfermedad o trastorno congénito. Se conocen técnicas para introducir y/o expresar genes *in vivo* por los expertos en la técnica. El médico puede seleccionar la técnica más adecuada para la proteína, célula o tejido diana indicada.

En consecuencia, la invención también se refiere a un vector de expresión según la invención, que puede inducir una alta tasa de entrada de ADN del vector en el núcleo de la célula huésped, o que puede aumentar la tasa de importación nuclear de ADN del vector, para tratar un huésped.

Según los aspectos anteriores de la invención, también se proporciona un kit. El kit puede contener al menos un ácido nucleico, al menos un vector, al menos un virus, o al menos una célula de la invención, o una combinación de cualquiera o todos éstos. El kit puede proporcionar cada una de las realizaciones anteriores de la invención, juntas en una única composición o separadas, tal como por ejemplo, en diferentes recipientes. En realizaciones, el kit incluye algunos o todos los reactivos y suministros necesarios para usar los ácidos nucleicos, vectores, virus, y células de la invención para el fin deseado.

La presente invención da a conocer un mecanismo original de importación nuclear de VIH-1 con un papel crucial de la estructura de ADN de tres cadenas, la triple hélice de ADN, en este mecanismo. EL VIH-1 ha desarrollado una estrategia de transcripción inversa compleja, mediante la cual un acontecimiento de desplazamiento de cadena central, que sigue a la iniciación y terminación central de la transcripción inversa, genera una triple hélice de ADN en el centro de las moléculas de ADN de VIH-1 lineal no integradas. Esta triple hélice de ADN actúa a su vez como un determinante activo en cis de la importación nuclear del genoma de VIH-1. La invención muestra que la iniciación y terminación central, dos etapas distintivas de la transcripción inversa de VIH-1, explican la capacidad del VIH-1 para infectar células diana que no se dividen.

Los ejemplos de la invención muestran además que la falta de ADN de triple hélice conduce a un virus que es casi no infeccioso en células que se dividen o que no se dividen. Aunque las mutaciones en cPPT no afectan a la tasa de síntesis de ADN viral o su capacidad para integrarse *in vitro*, la mayoría de las moléculas de ADN retrotranscrito a partir del virus mutante cPPT se acumula a lo largo del tiempo como ADN lineal no integrado. Por el contrario, se transforma ADN lineal del virus natural casi completamente en provirus integrados y círculos de ADN. El perfil de ADN intracelular de virus mutantes cPPT apunta a un defecto en la importación nuclear, acumulándose el ADN viral como moléculas lineales como consecuencia de su falta de acceso al compartimiento nuclear en el que puede integrarse o formar círculos. Un defecto tardío de la importación de ADN viral, que afecta lo más probablemente a la translocación por el NPC, se demuestra mediante el fraccionamiento de células infectadas y visualización directa (FISH) o ADN viral intracelular. Las moléculas de ADN lineales defectuosas se asocian con la membrana nuclear.

La invención se centra en el análisis de virus mutantes cPPT, que se caracterizan por la ausencia de la triple hélice de ADN central. Se llevó a cabo la mayoría de los experimentos presentados en el presente documento con virus mutantes CTS descritos anteriormente (Charneau *et al.*, 1994), con los mismos resultados (datos no mostrados). En el virus mutante CTS, la transcripción inversa produce moléculas de ADN lineales que contienen solapamientos de cadenas positivas distribuidos aleatoriamente, más grandes en comparación con la triple hélice de ADN central diferenciado del virus natural. Así, no solo la presencia de la triple hélice de ADN, sino también su integridad estructural, es importante para la importación nuclear de ADN de VIH.

ES 2 280 250 T3

La invención muestra que la triple hélice de ADN es operativa en el contexto de un sistema de vectores basado en VIH-1. Su inserción en un vector desprovisto de la triple hélice revierte un defecto fuerte de importación nuclear de ADN del vector hasta niveles naturales de importación nuclear.

5 La triple hélice de ADN central es un determinante de importación nuclear común de lentivirus. Se ha definido de forma precisa la localización de la triple hélice de ADN central en el caso de VIH-1. El desplazamiento de cadena central comienza en el primer nucleótido tras la secuencia cPPT (Charneau y Clavel, 1991) y se detiene en general a 99 nucleótidos en sentido 3', en el sitio de terminación dos de la secuencia CTS (Charneau *et al.*, 1994). La configuración tridimensional de las tres cadenas de ADN de la triple hélice todavía es desconocida. No obstante, puede generalizarse la presencia de la triple hélice de ADN en el centro del genoma a todos los lentivirus. Una copia central de PPT es una característica común de todos los genomas de lentivirus y un supuesto elemento de terminación de CTS, que se revela por la presencia de tractos (A)_n y (T)_n, también existe aproximadamente a 100 nucleótidos en sentido 3' (Charneau *et al.*, 1994). Se ha caracterizado recientemente la triple hélice de ADN central del lentivirus de ungulado VAIE (Stetor *et al.*, 1999). Una discontinuidad de cadena central en el ADN de virus VISNA, denominado hueco, pero más probablemente una muesca que resulta de un desplazamiento de cadena central, se reveló por una escisión de nucleasa S1 (Harris *et al.*, 1981). Puesto que se ha descrito la replicación independiente de mitosis para la mayoría de lentivirus (Gartner *et al.*, 1986; Thromar, 1963), el papel de la triple hélice de ADN en la importación nuclear descrita en el presente documento para VIH-1 puede generalizarse a todos los lentivirus.

20 Sin ser limitante, la invención proporciona una hipótesis mecanicista para el papel de la triple hélice de ADN central en la importación nuclear de VIH-1 tal como sigue: una estructura de ADN de tres cadenas que actúa como un determinante cis de su importación nuclear es un fenómeno biológico novedoso sin equivalentes virales o celulares conocidos. Cualquier hipótesis de un mecanismo molecular que describe el papel de la triple hélice de ADN central en la importación nuclear de VIH es por tanto especulativa. La triple hélice central puede actuar como un determinante viral para la iniciación de la captación del filamento de ADN de VIH a través del poro nuclear. Esto puede conseguirse mediante la interacción directa de la triple hélice de ADN con componentes del poro, o alternativamente mediante la interacción de la triple hélice con proteínas virales o celulares que se lanzan entre el citoplasma y el núcleo de la célula huésped y que pueden arrastrar el genoma del VIH al interior del núcleo. La translocación del genoma de VIH de 9,7 kb a través de un poro nuclear de diámetro máximo de 26 nm debe producirse en una orientación específica, tras el reconocimiento de un extremo del filamento de ADN de VIH-1 para iniciar la captación. Una situación similar surge en la exportación nuclear del ARN mensajero, en la que la captación del filamento de ARN a través del poro se guía mediante la estructura Cap en 5' (Hamm y Mattaj, 1990).

Aunque no se conoce bien la conformación de CPI de VIH-1, se ha establecido que los extremos de ADN lineal se unen entre sí, probablemente tras la dimerización de las proteínas integrasas unidas a las puntas de los LTR (Miller *et al.*, 1997). De manera interesante, las secuencias activas en cis cPPT y CTS se encuentran en una posición central en todos los genomas lentivirales. Una estructura lógica para los CPI lentivirales es un filamento de ADN doble, plegado simétricamente a cada lado de la triple hélice central por la dimerización de la integrasa (figura 6B). La triple hélice constituiría entonces un ápice del CPI de VIH-1 filamentosos y el dímero de integrasa el ápice opuesto. En CPI mutantes de cPPT, la ausencia de una triple hélice de ADN conduciría a su falta de reconocimiento por la maquinaria de poros nucleares de las proteínas lanzadoras. La identificación de los ligandos proteicos de la triple hélice de ADN central promete ser de máxima importancia tanto para entender la importación nuclear de CPI de VIH-1 y para el desarrollo eventual de fármacos que seleccionan como diana esta etapa de replicación del VIH.

45 Otra hipótesis mecanicista que explica las propiedades de virus mutantes de triple hélice implicaría un defecto en la maduración de cápsidas de VIH en CPI, antes de la translocación de ADN viral en el núcleo. Según este modelo, el ADN viral defectuoso de triple hélice permanecería atrapado como cápsidas virales integrales, que no pueden translocarse. La transcripción inversa retroviral no tiene lugar a altas diluciones de los componentes virales en el citoplasma de células infectadas, pero requiere el entorno estructural de un complejo de transcripción inversa en el que los componentes están confinados en un conjunto de proteínas de cápsida. El tamaño de la cápsida del VIH excede el máximo diámetro de exclusión de un poro nuclear (Dworetzky *et al.*, 1998; Gelderblom, 1991). Por tanto, antes de que el ADN viral pueda entrar en el núcleo, los complejos de transcripción inversa del VIH deben experimentar una maduración para dar CPI de tamaño compatible con la translocación a través de los poros nucleares (Karageorgos *et al.*, 1993). La maduración de cápsidas virales antes de la translocación nuclear está bien establecida en otros varios sistemas virales en los que el ciclo replicativo implica la translocación del genoma de ADN a través de la membrana nuclear de la célula huésped (Whittaker y Helenius, 1998). Mientras que la transcripción inversa en las cápsidas virales se ha demostrado físicamente para MLV (Bowerman *et al.*, 1999), esto no ha sido aún posible para el VIH-1 debido a la fragilidad de las cápsidas de VIH-1 (Barroto-Esoda y Boone, 1991). El complejo de transcripción inversa de VIH contiene varias copias de polimerasa TI (aproximadamente de 30 a 50 por cápsida) (Panet *et al.*, 1975). Debido a la distribución importante de transcriptasa inversa de VIH-1, se necesita una alta estequiometría de enzima con respecto un molde de ARN viral para superar varias etapas limitantes de transcripción inversa tales como transferencias de cadena o pausas de polimerización durante la síntesis de cadenas positivas y negativas y formación precisa de la triple hélice central (Klarman *et al.*, 1993; Charneau *et al.*, 1994). Esto sugiere firmemente que la terminación central, el último acontecimiento de la transcripción inversa lentiviral, se produce dentro de una estructura de cápsida integral. La terminación central, que marca el fin de la síntesis de ADN viral, puede ser una señal requerida para una descapsidación de ADN viral y su translocación posterior hacia el interior del núcleo.

Estos dos supuestos mecanismos moleculares para la importación nuclear mediada por la triple hélice de ADN de VIH-1 no son mutuamente excluyentes. La formación de una triple hélice de ADN central puede desencadenar la maduración de cápsidas virales en CPI, haciendo así accesible la triple hélice de ADN para lanzar proteínas.

5 El hecho de que se requiere la integridad de la triple hélice de ADN central para la entrada del genoma de VIH-1 en el núcleo de la célula huésped implica que el proceso completo de síntesis de ADN, incluyendo el último acontecimiento de desplazamiento de cadena, se completa antes de la translocación de CPI del VIH a través del poro nuclear. La distribución subcelular de la transcripción inversa lentiviral está debatiéndose actualmente y si la replicación del VIH se produce en un compartimiento celular específico todavía es una pregunta abierta. Basándose en estudios de fraccionamiento, se ha notificado que puede producirse la transcripción inversa del VIH completamente dentro del núcleo de la célula (Bukrinsky *et al.*, 1993a). Sin embargo, las técnicas de fraccionamiento no distinguen entre una localización intranuclear y una asociación con la membrana nuclear. Por el contrario, otros autores han propuesto que la asociación del complejo de transcripción inversa con el citoesqueleto es un requisito previo para la síntesis de ADN viral (Bukrinskaya *et al.*, 1998). Estudios cinéticos de la síntesis de ADN de VIH-1 y su asociación con la fracción nuclear indican que el último proceso es mucho más rápido que el primero. La síntesis de ADN de VIH-1 en el transcurso de un único ciclo de transcripción inversa sólo alcanza una meseta de 24 a 48 horas tras la infección, mientras que se fracciona más del 95% del ADN de VIH-1 con los núcleos de células infectadas tan pronto como de 4 a 6 horas tras la infección (Barbosa *et al.*, 1994). Por tanto, se favorece una tercera posibilidad de que la transcripción inversa lentiviral tenga lugar principalmente en la proximidad inmediata de la membrana nuclear y los NPC, dentro de la cápsida viral, aunque serán necesarios experimentos adicionales para confirmar esta hipótesis.

La mitosis celular no proporciona una ruta alternativa para la entrada del ADN viral defectuoso de triple hélice en el interior del núcleo de células huésped. Los presentes ejemplos muestran que los virus mutantes de triple hélice están muy impedidos en su capacidad de replicación no sólo en células diana que no se dividen, sino también en células diana que se dividen. A la inversa, la inserción de una secuencia de triple hélice de ADN en un vector basado en VIH-1 estimula la transducción génica en células tanto que se dividen como que no se dividen. Esto difiere del fenotipo publicado de virus mutantes MA/Vpr, en los que se ha descrito un defecto de replicación exclusivamente en células que no se dividen (Burkinsky *et al.*, 1993b; Heinzinger *et al.*, 1994; von Schwedler *et al.*, 1994). Por tanto, los mutantes del VIH MA/Vpr se comportarían como oncovirus dependientes de la mitosis. Una posible explicación para el diferente comportamiento de mutantes de triple hélice centrales es que estos virus carecen en una etapa tardía del proceso de importación nuclear, en consecuencia, se asocian las moléculas de ADN deficientes de triple hélice con la membrana nuclear. Esta asociación estrecha persiste durante la mitosis. El ADN viral mutante puede atraparse dentro de las vesículas de la membrana nuclear mitótica, en las que no pueden alcanzarse los cromosomas celulares, tal como se notificó en el caso de proteínas NLS-LacZ (Bonnerot *et al.*, 1987). Sin embargo, se sabe que las mutaciones en las NLS celulares, que inhiben interacciones con carioferinas inducen la acumulación citoplásmica de la proteína mutada (Kalderon *et al.*, 1984; Lanford y Butel, 1984). Por tanto, las mutaciones en las secuencias NLS que contribuyen a las propiedades carioplílicas de los CPI del VIH-1 deben inducir la retención citoplásmica del ADN viral, tal como se sugirió previamente (Gulizia *et al.*, 1994). Por tanto es posible que los CPI de los virus mutantes MA/Vpr alcancen los cromosomas celulares tras la ruptura de la membrana nuclear durante la mitosis. No obstante, no existe aún ninguna prueba experimental directa para una ruta de importación nuclear dependiente de mitosis de un genoma de ADN lentiviral. Tal como el fenotipo publicado de los virus mutantes MA/Vpr debe observarse con cierta precaución, la misma precaución debe aplicarse a la hipótesis inicial de que una deficiencia de importación nuclear en lentivirus debe conducir a un defecto de replicación en células que no se dividen exclusivamente. Si los lentivirus pueden adoptar una estrategia de importación nuclear dependiente de mitosis, o si la importación nuclear activa de genomas de lentivirus se produce en células tanto que se dividen como que no se dividen, continúa siendo una pregunta abierta.

La presente invención proporciona diseños para vectores lentivirales. Puesto que la infección de células diana que no se dividen por lentivirus depende de su uso de una ruta de importación nuclear activa, es importante mantener los determinantes de importación nuclear lentivirales en constructos de vector derivados. Los constructos de vector retrovirales clásicos son vectores de sustitución en los que todas las secuencias de codificación virales entre los LTR se eliminan y reemplazan por las secuencias de interés. En el caso de vectores lentivirales, esta estrategia clásica conduce a la delección de las secuencias activas en cis centrales cPPT y CTS. El papel importante de la triple hélice en la importación nuclear del VIH implica que tales constructos del vector de sustitución de este tipo no son óptimos. Por tanto, la inserción de la triple hélice de ADN del VIH en el vector de sustitución HR GFP (Naldini *et al.*, 1996) potenciaba su eficacia de transducción génica complementando un defecto de importación nuclear del genoma del vector HR a una tasa de importación de ADN próxima a la del VIH-1 natural.

Debe observarse que aunque los vectores VIH que carecen de una triple hélice de ADN fueron capaces todavía de la transducción génica (figuras 2C, 2D), la replicación residual de los virus mutados en cPPT falta o es extremadamente baja (figuras 6A, 6B). Una posible explicación es que la importación nuclear independiente de la triple hélice puede producirse en el caso de un genoma de vector pequeño (aproximadamente 4 kb para HR-GFP), pero se requiere la presencia de una triple hélice de ADN para la importación del genoma de VIH-1 nativo de 9,7 kb. De hecho, se ha notificado la importación nuclear activa, si relativamente ineficaz, de moléculas de ADN tan grandes como 3 o 4 kb (Hagstrom *et al.*, 1997).

Las secuencias activas en cis responsables de la formación de la triple hélice de ADN se encuentran en el centro de todos los genomas lentivirales. Esta posición central podría haber evolucionado debido a sus implicaciones estructurales para la conformación de CPI, en tanto que un plegado simétrico de los brazos izquierdo y derecho de una molécula

ES 2 280 250 T3

de ADN lineal alrededor de la triple hélice que podría ser necesario para su captación eficaz a través de los NPC (figura 7B). Si esto es cierto para el virus, entonces una posición central de la triple hélice de ADN podría requerirse también para la importación nuclear eficaz de genomas de vectores.

5 Ejemplos

Se clarificará adicionalmente la invención mediante los siguientes ejemplos, que pretenden ser puramente ejemplares de la invención.

10 Ejemplo 1

Procedimientos experimentales

Células

15 Las células MT4 son células T CD4+ humanas transformadas con VLTH-1 que permiten la infección del VIH-1 citopática aguda (Harada *et al.*, 1985). Las células H9 son menos permisivas al VIH pero permiten la producción crónica tras la infección. Se mantienen las células MT4 y H9 en un medio RPMI 1640 complementado con un 10% de suero de ternero fetal (FCS). Se obtuvieron linfocitos de sangre periférica (LSP) a partir de donantes saludables, estimulados con 1 µg/ml de fitohemaglutinina (Wellcome), y mantenida en presencia de interleucina-2 (Lymphocult al 20 10%; Biotest Diagnostics). Se hicieron crecer células 293T en un medio DMEM complementado con un 10% de FCS. Las células indicadoras P4 son células HeLa CD4+ que pueden infectarse por el VIH que llevan el gen LacZ bajo el control del LTR de VIH-1 (Charneau *et al.*, 1994). Se hacen crecer células P4 en un medio DMEM complementado con un 10% de FCS y 500 µg/ml de G418.

25 *Recogida y fraccionamiento de células*

Se recogieron muestras de sangre de cordón umbilical con el consentimiento informado de las madres. Se purificaron las células CD34+ tal como se describió anteriormente (Robin, C. *et al.*, 1999) usando un sistema de separación 30 de perlas inmunomagnéticas miniMACS (Milteny Biotec). La pureza de las células CD34+ separadas por perlas fue superior al 75%. Se purificaron adicionalmente fracciones CD34+CD38lo/- mediante ordenación celular con un FACS Vantage™ dotado con un láser de ión argón (Becton Dickinson), usando anticuerpos monoclonales murinos (Ac-Mo) dirigidos contra CD34-PE-Cy5 (Immunotech) y CD38-PE (Becton Dickinson). Las células CD34+ o bien se congelaron en suero de ternero fetal (FCS, célula madre) que contenía DMSO al 10% (Sigma) o bien se utilizaron 35 inmediatamente.

Constructos de ADN

Plásmidos provirales

40 Se realizó mutagénesis dirigida al sitio tal como se describió previamente (Kunkel, 1985) en M13mp18 que llevaba un inserto de 1,1 kb de *EcoRI* (de 4684 a 5779) del clon molecular infeccioso pLAI3. Los cebadores mutagénicos fueron tal como sigue:

45 cPPT-AG 5' pCAATTTTAAAAGAAGAG-GGGGGAATT 3' (SEQ ID NO:1)

cPPT-D: 5' pATTCATCCACAACCT-TCAAGCGCCGCGGTGGTATTGGGGGGTAC 3' (SEQ ID NO:2).

50 pcPPT-AG, pcPPT-D, pcPPT-25 y pCTS se construyeron clonando otra vez el fragmento de *EcoRI* mutado en pLAI3.

Plásmidos vectores

55 Se derivaron plásmidos vectores de HR'CMV-LacZ (Naldini *et al.*, 1996). Se substituyó el gen indicador LacZ por el gen EGFP (Clontech). Se amplificó el gen EGFP mediante PCR utilizando Pfu polimerasa (Stratagene) de plásmido pEGFP-N1, añadiendo sitios de restricción de *BamHI* y *XhoI* en los extremos 5' y 3' respectivamente. Los cebadores para PCR fueron tal como sigue:

60 Bam GFP: 5' CC GGATCC CCA CCG GTC GCC ACC 3' (SEQ ID NO:3)

Xho GFP: 5' CC CTCGAG CTA GAG TCG CGG CCG 3' (SEQ ID NO:4)

65 Se construyó el vector HR GFP volviendo a clonar su fragmento de PCR en los sitios *BamHI* y *XhoI* de pHR'CMV, acZ, substituyendo el ORF de lacZ por EGFP.

ES 2 280 250 T3

TRIP Δ U3 CMV GFP y TRIP Δ U3 PL CMV GFP:

5 En primer lugar, se construyó un subclón que contenía una única LTR y se denominó pUC LTR. Se clonó el fragmento *KpnI/XbaI* de TRIP GFP que abarca su LTR en 3' en pUC18. Después, se destruyó el sitio de *EcoRI* rellenando, creando el vector pUC LTR RI-. Se llevó a cabo una PCR de separación sobre pUC LTR RI- con el objetivo de amplificar todo el plásmido excepto el promotor y el potenciador de la secuencia U3. Los cebadores fueron:

DU3-: 5' CGGAATTCGGATCCGCGGCCGCATC-GATCTTGTCTTCGTTGGGAGTG 3' (SEQ ID NO:5)

10 DU3+: 5' CGGAATTCAGCCGTCTCGAGAGAT-GCTGCATATAAGCAGC 3' (SEQ ID NO:6)

15 Los cebadores contienen los sitios de restricción que deben insertarse en lugar de la secuencia del U3 incluyendo el sitio *EcoRI* presente en cada cebador. El producto de PCR se digirió con *EcoRI* y después se usó para transformar la bacteria competente. El plásmido construido de ese modo se nombró pLTR Δ U3 RI-.

El poliligador insertado en lugar de la secuencia U3 en pLTR Δ U3 RI- es:

ClaI-NotI-BamHI-EcoRI-MluI-XhoI.

20 Se construyó el plásmido TRIP Δ U3 PL GFP sustituyendo el fragmento *KpnI/NheI* de TRIP GFP que contenía la LTR en 3' con el fragmento *KpnI/XbaI* de pLTR Δ U3 RI- (los productos de restricción de *NheI* y *XbaI* son compatibles). A continuación se delecionó el poliligador (PL) de pLTR Δ U3 RI- mediante digestión con *ClaI/XhoI* y rellenando.

25 Se construyó el plásmido TRIP Δ U3 GFP intercambiando el fragmento *KpnI/NheI* de TRIP GFP con el fragmento *KpnI/XbaI* de pLTR U3 APL RI-.

30 Se amplificó un fragmento de 178 pb de pLAI3 (de 4793 a 4971), que engloba cPPT y CTS, mediante PCR. Se añadieron los sitios de restricción de *NarI* en 5' de los cebadores con el objetivo de insertar este fragmento en el sitio de *ClaI* único de HR GFP:

Nar TRIP+: 5' GTG GTC GGCGCC GAATTC ACAAAT GGC AGT ATT CAT CC 3' (SEQ ID NO:7)

35 Nar TRIP-: 5' GTC GTC GGCGCC CCA AAG TGGATC TCT GCT GTC C 3' (SEQ ID NO:8)

40 La inserción de esta secuencia de triple hélice en la orientación correcta dio lugar al vector de plásmido TRIP GFP, y TRIPinv GFP en la orientación inversa. Alternativamente, se amplificó el mismo fragmento de triple hélice de los plásmidos pcPPT-AG, pcPPTD, pcPPT-225, y pCTS para generar vectores que incluían las mismas mutaciones en la cPPT o en la CTS como los virus correspondientes.

TRIP EF1 α GFP y TRIP Δ U3 EF1 α GFP:

45 Se sustituyó el promotor CMV de TRIP GFP por el promotor EF1 α . En primer lugar se amplificaron la secuencia de triple hélice y el promotor EF1 α por separado, con cebadores solapantes. Se amplificó la secuencia de triple hélice con los cebadores Nar TRIP+ y Mlu TRIP- sobre la matriz pLai y se amplificó el promotor EF1 α sobre la matriz pEF-pgkneo con los cebadores Mlu EF1+ y Bam EF1-.

50 Nar TRIP+: 5' GTC GTC GGCGCC GAATTC ACAAAT GGC AGT ATT CAT CC 3' (SEQ ID NO:9)

MluTRIP-: 5' AGC CTC ACG ACGCGT AT CAG CCAAAG TGG ATC TCT GCT G 3' (SEQ ID NO:10)

55 Mlu EF1+: 5' CTG AT ACGCGT CGT GAG GCTCCG GTG 3' (SEQ ID NO:11)

Bam EF1-: 5' CG GGATCC TGT GTT CTG GCGGCA AAC3' (SEQ ID NO:12)

60 Entonces se realizó una segunda ronda de PCR en una mezcla de los dos primeros productos de PCR, usando los cebadores externos Nar TRIP+ y Bam EF1-. La secuencia de triple hélice y el promotor EF1 α se adhirió entre sí mediante esta técnica.

65 Se construyó el plásmido TRIP EF1 α GFP sustituyendo el fragmento *EcoRI/BamHI* de TRIP GFP que contenía la secuencia de triple hélice y el promotor CMV por el producto de PCR TRIP EF1 α digerido con *EcoRI/BamHI* (el cebador Nar TRIP+ tiene un sitio *EcoRI* en su extremo 5').

ES 2 280 250 T3

Para construir el plásmido TRIP Δ U3 EF1 α GFP, se insertó el fragmento *EcoRI/BamHI* de TRIP EF1 α GFP que contenía la secuencia de triple hélice y el promotor EF1 α en TRIP Δ U3 GFP en lugar del fragmento *EcoRI/BamHI* que contenía la secuencia de triple hélice y el promotor CMV.

5 *Producción de virus y vectores*

Para las investigaciones notificadas en las figuras 1-6, se produjeron los virus mediante una transfección transitoria de células HeLa mediante la técnica de coprecipitación de fosfato de calcio. Se produjeron partículas de vector mediante cotransfección transitoria de 293T mediante el plásmido de vector, un plásmido de encapsidación (p8.2) y un plásmido de expresión de la envuelta del VEV (pHCMV-G, (Yee *et al.*, 1994)), tal como se describió previamente (Naldini *et al.*, 1996). Todos los sobrenadantes de virus y de vectores se trataron con ADNasaI (1 μ g/ml en presencia de MgCl₂ 1 μ M) durante 15 minutos a 37°C.

15 *Producción de partículas del vector lentiviral*

Para las investigaciones notificadas en las figuras 7-9, se produjeron los virus mediante cotransfección transitoria de 293T mediante el plásmido de vector, un plásmido de encapsidación (p8.2) y un plásmido de expresión de la envuelta de VEV (pHCMV-G, (Yee *et al.*, 1994)), tal como se describió previamente (Naldini *et al.*, 1996). Todos los sobrenadantes de virus y vectores se trataron con ADNasaI (1 μ g/ml en presencia de MgCl₂ 1 μ M) durante 15 minutos a 37°C.

20 *Valoraciones de vectores y virus*

Para las investigaciones notificadas en las figuras 1-6, se realizó una valoración del ciclo de virus por triplicado mediante la infección de células P4 sembradas en placas de 96 pocillos, con cantidades equivalentes de partículas (1 ng de antígenos virales p24 por pocillo), en presencia de DEAE-dextrano 20 μ M. Se añadió el inhibidor de proteasa Saquinavir (Roche) (1 μ M) a lo largo de todo el experimento, para limitar el análisis a un único ciclo de infección. Se inhibió la mitosis celular mediante tratamiento con aficolina (8 μ M), el día antes de la infección. Se midió la actividad de la β -galactosidasa 48 horas tras la infección utilizando un ensayo con gen indicador β -Gal quimioluminiscente (Boehringer).

Se infectaron células HeLa por triplicado con cantidades equivalentes de partículas de vector (5 ng de P24 por pocillo). Se reemplazó el medio 48 horas tras la transducción por 200 μ l de TNB (Tris 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM) y se cuantificó la fluorescencia de células vivas utilizando un fluorímetro de microplaca (Victor², Wallac) y filtros adaptados EGCP (excitación: 485 nm, emisión 520 nm).

35 *Protocolo de transducción*

Para las investigaciones notificadas en las figuras 7-9, se recubrieron placas de cultivo tisular de 24 ó 96 pocillos con fibronectina (Bio-Whittaker Europe) según las instrucciones del fabricante. Se sembraron en placa poblaciones de CD34+, inmediatamente tras la purificación o descongelación, a de 2 a 3 x 10⁵ células/ml en un medio libre de suero (IMDM que contenía α -tioglicerol 11,5 μ M, BSA al 1,5% (ambas de Sigma), lípidos sonicados y transferrina humana saturada con hierro) o a-MEM que contenía FCS al 10% en presencia de 4 μ g/ml de polibreno (Sigma) y 4 citocinas humanas (hu) recombinantes (r): Factor celular de células madre rhu (SCF, 100 ng/ml, proporcionado por Amgen), ligando Flt3 (FL, 100 ng/ml, Diaclone), IL-3 (60 ng/ml, Sandoz), y factor de diferenciación y crecimiento de megacariocitos rhu pegilados (PEG) (MGDF) (10 ng/ml, Amgen), y virus lentiviral concentrado a la concentración de 100 ng de P24 viral /ml durante 24 horas. Se lavaron y cultivaron las células en condiciones linfomiélicas (en placas de cultivo tisular recubiertas previamente con células MS5 en RPMI complementado con suero humano al 10%, FCS al 5% y las siguientes 7 citocinas: rhu-SCF (50 ng/ml), rhu-FL (50 ng/ml), PEG-rhu-MGDF (50 ng/ml), rhu-IL-3 (10 ng/ml), rhu-IL-2 (5 ng/ml), rhu-IL-15 (10 ng/ml), y rhu-IL-7 (20 ng/ml) (siendo las tres IL de Diaclone) durante 48 horas. A continuación, se evaluó la expresión de eGFP en la fracción de células CD34+ usando AcMo CD34-PE-Cy5 (Immunotech). Se realizó el análisis en un FACS Scan usando el software Cellquest (Becton Dickinson).

55 *Ensayos de cultivo a largo plazo (LTC) y clonogénicos*

Se sometieron a ensayo progenitores clonogénicos de células CB recientes humanas en metilcelulosa al 0,8% que contenía FCS al 30%, BSA desionizado al 1%, y 2-mercaptoetanol 10⁻⁴M, en presencia de 50 ng/ml de rhu-SCF, 10 ng/ml de rhu-GCSF (Amgen), 2 ng/ml rhu-IL3, y 2 U/ml rhu-EPO (Amersham). Se sembraron en placas células de médula ósea (MO) de ratones NOD-SCID injertados en presencia de rhu-SCF, -IL-3, -EPO, y -GM-CSF (10 ng/ml) tal como se describe (Pflumio, F. *et al.*, 1996). Se puntuaron los progenitores en el día 14-16 según los criterios ya anteriormente (Croisille L. *et al.*, 1994) y se observó la expresión de EGFP mediante microscopía fluorescente usando un microscopio Nikon Eclipse TE300. Se realizó cultivo a largo plazo (LTC) tal como se describió anteriormente (Issaad C. *et al.*, 1993) tanto en dilución limitante en placas de 96 pocillos usando el FACS Vantage equipado con un ACDU (BD) como un cultivo en masa en placas de 24 pocillos que contenían una capa confluyente de la línea celular MS5 estromal murina. Tras de 5 a 10 semanas, se recogieron las células adherentes y no adherentes y se sembraron en placas para el ensayo clonogénico. Tanto para el ensayo LTC-IC como el clonogénico, se escogieron las colonias individualmente y se congelaron antes del análisis de PCR.

ES 2 280 250 T3

Análisis de PCR

Se realizó el análisis de PCR en ADN genómico obtenido o bien de colonias derivadas de progenitores clonogénicos o bien de clones crecidos en cultivos linfomiélicos. Se lisaron las células y se digirieron las proteínas en 20 μ l de tampón que contenía proteinasa K (10 μ g/ml), KCl (50 mM), Tris-HCl (10 mM, pH 8,3), MgCl₂ (2,5 mM), gelatina (0,1 mg/ml), NP40 (0,45%), y Tween 20 (0,45%). Se llevó a cabo la amplificación de ADN genómico con el cebador sentido

5' CCCTCGAGCTAGAGTCGCGGCCG 3' (SEQ ID NO:13)

y el cebador antisentido

5' CCGGATCCCCACCGGTCGCCACC 3' (SEQ ID NO:14)

a la temperatura de apareamiento de 62°C. La amplificación dio como resultado un producto de 800 pb.

Análisis de ADN de vector y viral

Se infectaron células P4 o MT4 con alta multiplicidad de virus (150 ng de p24 por 10⁶ células) o se transdujeron mediante vectores (25 ng de p24 por 10⁶ células), en presencia de 20 μ g/ml de DEAE-dextrano en el caso de células P4. Se extrajo el ADN de células infectadas o transducidas a diferentes momentos, se cortó, y se analizó mediante inmunotransferencia de tipo Southern. En todos los casos, se eliminó el ADN de plásmido de bacterias contaminantes del análisis mediante digestión por *DpnI*. Se digirió el ADN de células infectadas por *MscI* y *XhoI* y el ADN de células transducidas por *EcoNI*, *AvaII* y *XhoI*. Tras la electroforesis y la transferencia de 10 μ g de ADN digerido, se hibridaron las membranas con sondas de ADN marcadas con [³²P] preparadas con cebadores al azar (Rediprime II, Amersham). Se amplificó el ADN específico de virus mediante PCR a partir de un molde de plásmido pLAI3 usando los siguientes cebadores:

5Msc: 5' AGA AGA AAT GAT GAC AGC ATG 3' (SEQ ID NO:15)

3Msc: 5' TGC CAG TTC TAG CTC TG 3' (SEQ ID NO:16).

El fragmento de ADN de 1680 pb resultante (desde la posición 1818 hasta 3498 de pLAI3) solapa el sitio de restricción de *MscI* en la posición 2655 de genomas virales.

Se sintetizó la sonda de vector mediante PCR en pTRIP GFP con los cebadores:

5EcoNI: 5' CAG GGA CTT GAA AGC GAA AG 3' (SEQ ID NO:17)

3EcoNI: 5' GCT TGT GTA ATT GTT AAT TTC TCT GTC 3' (SEQ ID NO:18)

La sonda de vector es un fragmento de 1027 pb (desde la posición 649 hasta 1676 de pTRIP GFP) y solapa el sitio de *EcoNI* en la posición 1156 de los genomas de vector.

Para someter a ensayo la cantidad de ADN retrotranscrito a partir del tipo natural y virus PPT-AG y cPPT-D, se siguió un protocolo similar excepto que el ADN extraído 12 horas tras la infección se cortó mediante *MscI* y *DpnI*. La sonda usada para la hibridación fue el fragmento interno *MscI* de 1,9 kb de pLAI3. Se cuantificaron las señales de hibridación usando un sistema de detección y cuantificación de la reactividad (Molecular Dynamics) y el software ImageQuant.

Hibridación in situ

Se infectaron células P4 a alta multiplicidad (2 μ g de antígeno p24 de cada virus por 10⁶ células), en presencia de 20 μ g/ml de DEAE-dextrano. A las 24 horas después de la infección, se tripsinizaron las células, se lavaron exhaustivamente (con el fin de eliminar partículas virales captadas en la membrana plasmática), y volvieron a sembrarse en placas sobre portaobjetos de vidrio en placas de 24 pocillos. Se hicieron crecer las células durante 48 horas más y se fijaron en PFA al 4%/PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron las células en PBS y se permeabilizaron con Triton al 0,5%/Saponin al 0,5% en PBS, durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se trataron las muestras deshidratadas con ARNasa A (200 μ g/ml in 2X SSC), una hora a 37°C y con proteinasa K (6 μ g/ml in PBS), aproximadamente 5 minutos. Se desnaturalizaron las muestras mediante incubación en formamida desionizada al 70%/2X SSC durante 2 minutos a 70°C seguido por formamida desionizada al 30%/2X SSC durante 2 minutos a 70°C. Se realizaron las hibridaciones durante la noche a 37°C usando un plásmido pLAI3 biotinilado con traslado de mellas (formamida desionizada al 50%, sulfato de dextrano al 10%, 10 μ g/ml de ADN de esperma de salmón, Tween 20 al 0,1% en 2X SSC). Se lavaron exhaustivamente las muestras (se lavaron en serie en 2X SSC/formamida al 50%

ES 2 280 250 T3

a temperatura ambiente y después a 50°C). Se llevó a cabo la detección de las sondas hibridadas usando el kit TSA-Direct de tiramida- estreptavidina (NEN) según las instrucciones del fabricante

Ejemplo 2

5

La iniciación central de la transcripción inversa es una etapa esencial del ciclo de replicación del VIH-1

En trabajos anteriores, se mostró que las mutaciones conservativas en las secuencias cPPT y CTS perjudican gravemente la replicación de virus (Charneau *et al.*, 1992; Hungnes *et al.*, 1992). Un virus mutante de iniciación central (cPPT-225) y un virus mutante de terminación (CTS) mostraron una disminución de la infección de cuatro y diez veces respectivamente en una ronda de experimentos de valoración. Con el fin de inactivar la función del cPPT, se introdujeron mutaciones semiconservativas en la región de solapamiento de codificación de la integrasa. En el virus mutante cPPT-D, el cambio de lisina por arginina en la posición 188 permitió la introducción de un total de 10 mutaciones en la secuencia de 19 nucleótidos del cebador de PPT (figura 1A) (Huber y Richardson, 1990). El efecto de este cambio de aminoácidos en la replicación de virus se comprobó mediante la construcción del virus mutante cPPT-AG control, en el que una única mutación de purina por purina, respetando la naturaleza de polipurina del cPPT, indujo el mismo cambio de aminoácidos. La presencia de una triple hélice de ADN en ADN virus cPPT-AG y de tipo natural retrotranscrito, y su ausencia de ADN de virus cPPT-D, se confirmó mediante escisión por S 1 nucleasa de ADN de Hirt a partir de células infectadas tal como se describió anteriormente (Harris *et al.*, 1981; Charneau y Clavel, 1991).

Se evaluó en primer lugar la infectividad de virus en experimentos de replicación cinética clásica en cultivos celulares. Se infectaron los linfocitos de sangre periférica (LSP) estimulados con FHA y células MT4 con números iguales de partículas virales, normalizadas según el contenido de proteína cápsida (p24) de los sobrenadantes virales, y se siguió la actividad de la transcriptasa inversa en sobrenadantes de cultivos (figura 1B). Las curvas de crecimiento de virus control cPPT-AG y VIH-1 LAI de tipo natural fueron similares en ambos sistemas celulares. El hecho de que la mutación de K188R se produce de manera natural naturalmente en algunos aislados de VIH-1, sugiere ya que tiene poco o ningún efecto sobre las funciones de la integrasa y PPT. Por el contrario, cuando se infectan LSP con el virus mutante cPPT-D, no se detectó ninguna replicación durante los 15 días del cultivo. Lo mismo fue cierto para células MT4, a pasar de su alta susceptibilidad a la infección por el VIH. El virus mutante cPPT-D tampoco fue infeccioso en líneas de células inmortalizadas tales como H9 o CEM (datos no mostrados).

Se analizó cuantitativamente la infectividad de virus mediante valoraciones basadas en una única ronda de replicación (figura 1C). Se infectaron las células indicadoras P4 (HeLa CD4 LTR-LacZ) (Charneau *et al.*, 1994) con números equivalentes de partículas de virus de diferentes virus. Estas valoraciones de un ciclo confirmaron la pérdida casi total de infectividad del virus mutante cPPT-D. En células P4, la infectividad del control de cPPT-AG fue idéntica a la del virus de tipo natural, mientras que la infectividad del mutante cPPT-D se redujo mucho, a niveles próximos a los iniciales. Se obtuvieron los mismos resultados en células P4 que no se dividen tratadas con afidicolina (figura 1C, panel derecho).

40

Estos hallazgos sugieren firmemente que la iniciación central de la transcripción inversa es necesaria para la replicación de VIH en células que proliferan así como en células que no se dividen.

Ejemplo 3

45

La producción de virus no resulta afectada por mutaciones en cPPT

Se comprobó que las diferentes mutaciones introducidas en los provirus de plásmidos cPPT-D y cPPT-AG no afectaron a las etapas finales del ciclo de replicación. Se cuantificó la producción de virus, según el contenido de P24 de los sobrenadantes, tras transfecciones transitorias de células HeLa mediante plásmidos provirales. Se encontró que la producción de virus mutantes de cPPT no era significativamente diferente de la del virus de tipo natural (figura 2A). Por tanto, la mutación K188R no afecta la fase final de la replicación del VIH-1. Por tanto, la etapa defectuosa implicada en el fenotipo del virus mutante cPPT-D debe preceder la expresión de ADN viral y pertenecer a la fase temprana del ciclo de replicación del VIH.

55

Ejemplo 4

Las mutaciones en el cPPT no afectan a la tasa de transcripción inversa del genoma de VIH-1

El efecto de las mutaciones en c-PPT sobre la síntesis de ADN viral se evaluó cuantificando el ADN sintetizado en una única ronda de retrotranscripción (figura 2B). Se detectó un fragmento de restricción de *MscI* interno del ADN viral de células infectadas mediante inmunotransferencia de tipo Southern y se cuantificó, usando el correspondiente fragmento de ADN de *MscI* como una sonda. Puesto que el fragmento de *MscI* interno es común al ADN proviral integrado y las moléculas lineales y circulares no integradas, su cuantificación refleja la cantidad total de ADN viral, independientemente de su estado integrado o no integrado. Para limitar el análisis al primer ciclo de transcripción inversa, se recogió el ADN de células P4 infectadas 12 horas tras la infección, antes de la iniciación de una segunda ronda de infección. La cantidad total de ADN retrotranscrito en un único ciclo de transcripción inversa fue el mismo tras la infección con el mutante cPPT-D, control cPPT-AG o virus de tipo natural. Estos experimentos mostraron que,

ES 2 280 250 T3

aunque las mutaciones en cPPT impiden la replicación de virus, no afectan la tasa de síntesis de ADN. El defecto replicativo de virus mutantes cPPT implica una etapa posterior a la síntesis de ADN viral.

Ejemplo 5

5 *La carencia de una triple hélice de ADN central no afecta la integración in vitro de los CPI de VIH-1*

Se comparó la capacidad de integración *in vitro* de los CPI del VIH-1 de tipo natural y los mutantes de iniciación centrales (figura 2C) usando un ensayo de integración *in vitro* cuantitativo tal como se describió por Farnet (Farnet y Haseltine, 1990), con modificaciones secundarias. Puesto que los complejos de replicación del VIH-1 residen solo transitoriamente en el citoplasma de células recién infectadas (Barbosa *et al.*, 1994), la preparación de cantidades suficientes de CPI de VIH requiere infección masiva y fraccionamiento celular en un plazo de 4 a 6 horas. Esto se logró mediante el cocultivo de células H9 infectadas crónicamente mediante o bien el virus cPPT-225 o de tipo natural y células diana HUT78 no infectadas. Se seleccionó el virus mutante cPPT-0225 (figura 1A) para estos experimentos en lugar del cPPT-D no infeccioso, que no puede establecer una infección crónica. La infectividad residual del virus mutante cPPT-225 es baja, pero suficiente para permitir que se propague lentamente en cultivos celulares (Charneau *et al.*, 1992).

Se aislaron CPI de VIH del citoplasma de células infectadas y se incubaron en presencia de ADN diana plásmido Bluescript linealizado. Se reveló la integración mediante la presencia de un fragmento de 12,7 kb, reactivo frente a la sonda de VIH-1, correspondiente al tamaño esperado del genoma de VIH lineal de 9,7 kb integrado en el ADN diana de 3 kb.

La cantidad de ADN lineal integrado en el ADN de plásmido no se diferenció entre el virus tipo natural y el mutante cPPT 225 (figura 2C). Por tanto, los CPI de VIH-1 del mutante cPPT conservaron su capacidad completa para integrarse *in vitro*. La etapa de replicación defectuosa de los virus mutantes de la triple hélice de ADN central debe encontrarse tras la transcripción inversa pero antes de la integración de su genoma de VIH en la cromatina de la célula huésped.

Ejemplo 6

Importación nuclear dañada de virus mutantes de triple hélice de ADN central

Los experimentos anteriores sugirieron que el defecto de replicación de los virus mutantes de triple hélice de ADN central estaba relacionado con el acceso de CPI de VIH a la cromatina de la diana celular. Por lo tanto, se examinó la hipótesis de un defecto de importación nuclear de ADN de virus mutantes cPPT.

Se impidieron estudios sobre la importación nuclear de CPI de VIH-1 debido a una carencia de un ensayo reproducible y cuantitativo para la importación nuclear al nivel de ADN viral. Una vez que se retrotranscribió en el citoplasma, el ADN lineal retroviral se importa dentro del núcleo donde o bien se integra, o bien se circulariza. Los círculos de ADN retroviral que no se integran, que contienen una o dos LTR, se encuentran exclusivamente dentro del núcleo, y por tanto representan marcadores convenientes de la importación nuclear de ADN viral. Para evaluar la importación nuclear de ADN de VIH, se usó amplificación por PCR en estudios anteriores de dos círculos de ADN de LTR que no se integraron. Sin embargo, tal como se notificó en el presente documento y por Barbosa *et al.*, (1994), debido a que círculos de dos LTR representan una fracción mínima del ADN de VIH en células infectadas, su detección es muy sensible a alteraciones menores de la infectividad de virus o fisiología celular. Por tanto, se diseñó un ensayo novedoso que permite un seguimiento cuantitativo de la síntesis, circularización e integración de ADN de VIH mediante inmunotransferencia de tipo Southern.

Brevemente, se prepara el ADN de células infectadas en varios puntos de tiempo y se digiere con *MscI*, una enzima de restricción que corta el genoma de VIH-1 dos veces. Usando una sonda de ADN generada mediante PCR que solapa exactamente el sitio de *MscI* en 5', se revelan varias bandas específicas (figura 3A). El fragmento de *MscI* interno de 1,9 kb es común a todas las especies de ADN virales independientemente de su estado integrado o no integrado y la cuantificación de su banda indica la cantidad total de ADN viral de células infectadas. Una banda de 2,6 kb corresponde al fragmento de *MscI* en 5' distal de ADN de VIH lineal no integrado. Para minimizar el sesgo de transferencia debido al gran tamaño de los fragmentos específicos de círculos de ADN, el ADN se corta adicionalmente con *XhoI*. ADN circular de una o dos LTR aparece a continuación en bandas de 2,8 y 3,4 kb respectivamente. Puesto que la sonda de ADN solapa exactamente el sitio en 5' de *MscI*, la intensidad de cada banda es directamente proporcional a la cantidad de especies de ADN viral correspondientes. Se calcula la cantidad de ADN proviral integrado sustrayendo las señales de ADN virales circulares y lineales no integrados de la cantidad total de ADN viral. Se llevó a cabo una cuantificación paralela de la misma población de células infectadas tras un fraccionamiento de Hirt para separar ADN viral no integrado de bajo peso molecular de ADN proviral integrado de alto peso molecular. Esto originó idénticos resultados, validando así el cálculo por sustracción de una etapa.

Tal como se indicó mediante la cinética de acumulación de ADN viral total (fragmento interno de 1,9 kb), la síntesis de ADN viral avanzó durante de 24 a 48 horas tras la infección, reflejando un proceso de infección asincrónico. Las cantidades de ADN viral total de virus mutantes cPPT-AG y cPPT-D fueron similares a aquellas del VIH-1 de tipo natural. Como anteriormente, las mutaciones en cPPT no influyeron sobre la tasa de síntesis de ADN. Cantidades

detectables de ADN lineal no integrado de longitud completa estuvieron presentes en células tan sólo 6 horas tras la infección (figura 3B). Los círculos de ADN y provirus integrados se detectaron por primera vez 12 horas tras la infección. La integración y circularización avanzó hasta su terminación durante 36 horas más.

5 Al terminar un ciclo de infección, en el caso del virus de tipo natural, se había integrado aproximadamente el 55% de ADN viral en el ADN de la célula huésped, aproximadamente el 35% se había circularizado en un círculo de LTR, y una pequeña fracción de menos del 10% permaneció en la forma de ADN lineal no integrado estable (figura 3c). Notablemente, estuvo presente ADN circular de dos LTR sólo en cantidades de trazas, aunque pudo detectarse 48 horas tras la infección. Se trató el ADN del virus control cPPT-AG de una manera muy similar al ADN del virus de
10 tipo natural.

En el caso del virus mutante cPPT-D, una alteración marcada en el patrón de ADN viral intracelular fue evidente, con una acumulación clara y repetida de moléculas lineales no integradas. 48 horas después de la infección, solo se habían generado cantidades muy pequeñas de ADN circular de una LTR y de ADN proviral integrado y más de un
15 90% del ADN mutante de cPPT-D permaneció bloqueado en forma lineal no integrada (figura 3C).

Se espera que un defecto de importación nuclear disminuya la proporción de especies de ADN virales nucleares (virus integrados y círculos de una o dos LTR) y que aumente concomitantemente la proporción de moléculas de ADN lineales que no se translocan. Por tanto, el perfil de ADN intracelular de virus mutante cPPT-D sugiere firmemente un
20 defecto de importación nuclear de ADN viral.

Ejemplo 7

El ADN lineal de virus mutantes de triple hélice de ADN central se acumula en la proximidad de membrana nuclear
25

Para caracterizar adicionalmente el defecto de importación nuclear de virus mutantes de triple hélice de ADN central, se trataron las cuestiones de si las moléculas de ADN lineal mutado se acumulaban en un compartimento subcelular particular. El proceso de importación nuclear puede dividirse en dos fases principales, el acoplamiento del componente nuclear a la membrana nuclear y su translocación a través del complejo de poro nuclear (NPC). Se realizó
30 en primer lugar el fraccionamiento clásico de núcleos/citoplasma de células infectadas, seguido por detección de ADN viral mediante inmunotransferencia de tipo Southern. Se asoció la totalidad de ADN viral de todos los virus con los núcleos de células P4 infectadas, 24 horas tras la infección (figura 4A), sugiriendo que el acoplamiento de ADN del VIH a la membrana nuclear no se veía afectado por la carencia de triple hélice de ADN central.

35 Para confirmar que las moléculas de ADN deficientes en triple hélice central se acumulan en la membrana nuclear, se usó hibridación *in situ* fluorescente (FISH) para visualizar directamente la ubicación intracelular de genomas del VIH. Se infectaron células P4 a multiplicidad alta en condiciones de un ciclo, se hibridaron con una sonda de genoma del VIH-1 de longitud completa, y se observó mediante microscopía de desconvolución. Se encontraron puntos específicos predominantemente dentro del núcleo en el caso de virus de tipo natural y control cPPT-AG (figura 4B).
40 Puesto que FISH no puede distinguir entre las diferentes especies de ADN del VIH, estas moléculas de ADN viral intranucleares podían ser provirus integrados o círculos de ADN no integrados. Se asociaron algunos genomas poco frecuentes con la membrana nuclear y probablemente representaron el ADN lineal residual que se detectó mediante inmunotransferencia de tipo Southern al mismo tiempo tras la infección. Otros puntos asociados con la membrana plasmática se derivaron posiblemente de las partículas defectuosas adsorbidas en la membrana que contenían genomas parcialmente retrotranscritos (Lori *et al.*, 1992). Por el contrario, los genomas de VIH se ubicaron mayoritariamente en la membrana nuclear y estuvieron completamente ausentes del núcleo en el caso del virus mutante cPPT-D. Puesto que el perfil de ADN de inmunotransferencia de tipo Southern indicó que se bloqueó prácticamente todo el ADN de cPPT-D en la forma lineal, todavía puede asumirse que estos genomas del VIH asociados con la membrana nuclear eran moléculas de ADN lineal no integrado. Esta visualización directa de moléculas de ADN viral en células infectadas
50 confirmó la asociación del ADN viral de mutantes de triple hélice central con la membrana nuclear.

Los experimentos FISH realizados sugieren que los virus mutantes cPPT son defectuosos en la translocación de su genoma a través de los NPC. Sin embargo, la prueba clara de un defecto de translocación, mediante localización de ADN viral mutante en el lado citoplasmático de los NPC, no es accesible mediante experimentos FISH.
55

En conjunto, se concluye a partir de estos resultados que la triple hélice de ADN central del VIH-1, creada mediante etapas de iniciación y terminación central durante la transcripción inversa, es importante para que los CPI del VIH-1 entren en el núcleo de la célula huésped. En ausencia de triple hélice de ADN, se daña gravemente la importación nuclear de ADN viral en una fase inmediatamente anterior o durante la translocación de ADN del VIH-1 a través del poro nuclear.
60

Ejemplo 8

Impacto de la triple hélice de ADN central sobre la transducción génica mediante un sistema de vector basado en VIH-1
65

Habiendo identificado la triple hélice de ADN central, como determinante clave para la importación nuclear de VIH-1, se sometió a prueba el efecto de insertar las secuencias activas en cis centrales de VIH-1 en el vector VIH-

ES 2 280 250 T3

1 de HR anteriormente descrito (Naldini *et al.*, 1996) (figura 5A). Para monitorizar la transducción génica, se insertó además un gen que codificaba para la proteína fluorescente verde (GFP). El vector que contenía una secuencia de triple hélice de ADN se llamó TRIP GFP. Los controles incluían constructos similares con cPPT o CTS mutados y una región central de tipo natural insertada en orientación inversa, no funcional (TRIP_{inv} GFP). La presencia de una triple hélice de ADN en ADN de vector TRIP GFP retrotranscrito, y su ausencia en HR GFP, TRIP_{inv} GFP, y de vectores que contenían una versión mutada de la secuencia de triple hélice central, se confirmó mediante escisión por S 1 nucleasa de ADN de Hirt aislado de células transducidas.

El número de partículas de vector producidas por transfección transitoria se normalizó antes de la transducción según los niveles de proteína cápsida (p24), actividad de la transcriptasa inversa, y la cantidad de ARN de vector genómico en sobrenadantes de células transfectadas. Se obtuvo producción similar de los diversos vectores, con una relación lineal entre los tres criterios de normalización (datos no mostrados). Por tanto, la inserción de la región central del genoma del VIH-1 en el vector HR no tuvo influencia sobre la tasa de encapsidación de ARN genómico. Se transdujeron células HeLa que pueden dividirse y que no pueden dividirse (tratadas con afidicolina), con números equivalentes de partículas de vectores HR-GFP o TRIP-GFP y se monitorizó la expresión de GFP 48 horas después mediante cuantificación de la fluorescencia. Se calculó la pseudotransducción de actividad de GFP debida a la administración directa de proteínas GFP a células diana mediante las partículas de vector de fusión a partir de la transducción de células tratadas con un inhibidor TI del VIH-1 (nevirapina 1 μ M, Boehringer Ingelheim) y se sustrajo el fondo de la señal de fluorescencia. Se eliminó la fluorescencia no específica debida a la transfección secundaria provocada por el coprecipitado de ADN de calcio/fosfato en los sobrenadantes de vector tratando el vector madre con ADNasa I antes de la transducción.

En estas condiciones, la presencia de la secuencia de triple hélice en el vector del VIH aumento la transducción de GFP en células HeLa más de diez veces (figura 5B). Se observó una potenciación similar de la transducción génica en otras líneas celulares diana tales como MT4 o 193T (datos no mostrados). Se perdió este efecto si se insertaba la secuencia de triple hélice en orientación inversa (figura 5B) o mutada en el cPPT (no mostrado).

Ejemplo 9

La presencia de triple hélice de ADN en los vectores de VIH-1 aumenta la tasa de importación nuclear de genoma de vector hasta niveles de tipo natural

Fue de interés determinar si el aumento de la fluorescencia de GFP inducida por inserción de una secuencia de triple hélice en el vector del VIH se debió a su efecto sobre la importación nuclear del vector ADN. Para tratar esta cuestión, se adaptó el ensayo de inmunotransferencia de tipo Southern cuantitativo para detectar ADN viral intracelular al sistema de vectores. El ADN de células transducidas con vector se digirió con *Eco*NI y *Ava*II para producir un fragmento de 0,8 kb interno, y con *Xho*I. Usando una sonda de ADN generada por PCR que solapaba exactamente el sitio de *Eco*NI, se esperaron señales específicas para el genoma de vector lineal no integrado, y para círculos de ADN de una y dos LTR a 1,2 kb, 1,4 kb, y 2 kb respectivamente. Se analizó el tratamiento del ADN de vector en varios puntos de tiempo tras la transducción de células HeLa.

La cantidad total de ADN de vector sintetizado en células transducidas fue comparable para vectores que contenían o carecían de triple hélice de ADN (figura 5C). Una vez más, la inserción de secuencias de cPPT y CTS, en cualquier orientación, en el vector HR no influyó sobre la tasa de transcripción inversa de su genoma. Tras la cuantificación por sistema de detección y cuantificación de la radiactividad, se encontró que el destino intracelular del ADN de vectores HR-GFP y TRIP_{inv}-GFP (figura 5D) se asemejaba estrechamente al del ADN de virus defectuosos de triple hélice central y el destino del ADN del vector TRIP-GFP seguía al del ADN de virus VIH-1 LA1 de tipo natural (figura 3C).

Un defecto de la importación nuclear de ADN resultó evidente en el caso de vectores HR-GFP y TRIP_{inv}-GFP. El destino intracelular del ADN de estos vectores se caracterizó por una fuerte acumulación de moléculas lineales no integradas, junto con pequeñas cantidades de provirus integrados y círculos de una y dos LTR. Este perfil de ADN recordaba firmemente al del virus mutante cPPT-D. Al terminar el tratamiento del ADN de vector en células transducidas, del 70% al 80% del ADN de los constructos de HR-GFP y TRIP_{inv}-GFP permanecieron en la forma de moléculas lineales no integradas, mientras que solo del 10 al 15% estuvieron presentes como no integrados en círculos de LTR y del 5 al 10% como provirus integrados. Esta cantidad baja pero detectable del ADN de vector integrado explicaría la transducción génica obtenida usando los vectores HR-GFP y TRIP_{inv}-GFP.

Este ensayo cuantitativo también mostró que la inserción de la secuencia de triple hélice de ADN de VIH en el vector HR en la orientación correcta complementa su deficiencia de importación nuclear hasta niveles de tipo natural. El estado final del ADN de TRIP-GFP en células transducidas fue similar al observado con virus del VIH-1 de tipo natural: el 50% o más del ADN de vector integró la cromatina de la célula diana, una fracción importante circularizó y unas pocas moléculas permanecieron como ADN lineal no integrado (compárense las figuras 5D y 3C). Al contrario, la inserción de la secuencia de triple hélice en el vector HR en el sentido 5' del promotor CMV interno no tuvo influencia sobre la expresión de GFP a nivel transcripcional. Esto se comprobó mediante la transfección de células HeLa con plásmidos pHR-GFP, pTRIPGFP, y pTRIP_{inv}-GFP y cuantificación de fluorescencia (datos no mostrados).

ES 2 280 250 T3

Puede deducirse a partir de estos resultados que el aumento de la transducción de GFP obtenido con el vector TRIP-GFP puede atribuirse completamente a la fuerte estimulación de su importación nuclear mediante la presencia de la triple hélice. Este hallazgo enfatiza de nuevo el papel importante de la triple hélice de ADN de VIH en la importación nuclear de ADN viral y de vector.

5 Ejemplo 10

Los vectores de VIH-1 que contienen la secuencia de triple hélice de ADN permiten una transferencia génica eficaz en células madre hematopoyéticas

10 Las figuras 7A y 7B ilustran los resultados de dos experimentos de transducción satisfactorios usando células de sangre del cordón umbilical humano CD34+. Se mostró que tras un protocolo de transducción corto de 24 ó 60 horas, el 71,5% y más del 90%, respectivamente, de las células CD34+ expresaron firmemente la proteína indicadora GFP. Esta expresión refleja la transducción estable de las células puesto que se confirmó la integración viral, al menos en 15 las mismas proporciones, mediante ensayos de PCR en ADN extraído a partir de colonias de células derivadas de los progenitores cultivadas 14 días tras haber sembrado células en el ensayo de progenitor clonagénico. Se han obtenido resultados idénticos usando células CD34+ recién purificadas o las mismas células CD34+ que se han congelado después de la purificación y se han descongelado varias semanas después para el experimento de transducción. También se obtuvieron eficacias de transducción comparables usando otra fuente de células madre hematopoyéticas, células 20 madre movilizadas de sangre periférica (PBMC), recogidas mediante citaféresis tras la estimulación con citocina. También se transdujeron PBMC CD34+ o bien inmediatamente tras la purificación o bien tras una etapa de congelación/descongelación con resultados idénticos. Usando un cultivo a largo plazo (LTC) y ensayos de repoblación NOD-SCID se mostró que se había transducido células que tenían múltiples potencialidades linfomiéloides y la capacidad para repoblar médula ósea de ratón NOD-SCID 4 meses tras el injerto. Estos ensayos funcionales representan el último 25 experimento disponible, en el momento, para evaluar la función de las células madre hematopoyéticas humanas.

Ejemplo 11

La presencia de la secuencia de triple hélice de ADN en constructos de vector lentiviral estimula fuertemente la transferencia génica dentro de células madre hematopoyéticas

Se diseñó el experimento de dosis/respuesta notificado en la figura 8 (representativo de 3 experimentos) para comparar la eficacia de la transducción en células madre hematopoyéticas humanas de vectores de VIH-1 que incluyen o carecen de la secuencia de triple hélice de ADN. En primer lugar se representó gráficamente (A) el porcentaje de 35 células CD34+eGFP+ obtenidas como una función de la concentración del vector usado para la transducción. Se observó que independientemente de la dosis de vector, el vector TRIP+ fue más eficaz que el de TRIP, con una media respectivamente del $40 \pm 19\%$ y el $15,4 \pm 12,5\%$ de células CD34+ que son eGFP+ para 500 ng de P24 viral/ml de cada vector (n= 3 exp). Se obtuvo un aumento de 4-6 veces en el porcentaje final de células GFP+ tras la transducción por el vector TRIP-GFP comparado con los resultados obtenidos tras la transducción con el vector HR-GFP. Se resalta 40 también la diferencia en la eficacia entre los dos vectores cuando se representa gráficamente la media de la intensidad de la fluorescencia en función de la dosis de virus. Se alcanza una meseta para el vector TRIP-(HR-GFP) a una dosis de 100 ng de P24/ml mientras que la intensidad de la fluorescencia en células transducidas aumenta con la dosis de vector TRIP+. Esto pudo reflejar la limitación en la importación nuclear de las formas preintegrativas del vector TRIP- y el número creciente de copias integradas por célula tras la transducción con dosis crecientes del vector TRIP-GFP. 45 La tercera representación gráfica integra ambos aspectos y muestra el efecto resultante de la secuencia de triple hélice de ADN sobre la actividad de la fluorescencia en CMH humanas. Tal como se muestra, la presencia de la secuencia de triple hélice de ADN en el vector VIH induce un aumento de la producción de GFP en CMH de más de diez veces.

Ejemplo 12

Una fracción de copias integradas de genomas de vector de VIH permanece en silencio en células transducidas hematopoyéticas humanas

Es posible que se produzca la inactivación del transgén integrado. La eficacia de la transferencia fue siempre mejor 55 cuando se evalúa mediante el porcentaje de colonias celulares derivadas del progenitor transducidas determinadas mediante ensayo de PCR para el vector lentiviral integrado en lugar de cuando se evalúa mediante el porcentaje de células CD34+/eGFP+ determinadas mediante análisis FACS 48 horas después del final del protocolo de transducción. Esto refleja la frecuencia de provirus transcripcionalmente inactivos debido o bien a su sitio de integración o bien a la inactivación aleatoria y progresiva del provirus mientras las células proliferan y se diferencian. Se han observado 60 colonias derivadas de un único progenitor clonagénico mielóide que algunos de los subclones pueden ser brillantes para GFP mientras que otros fueron negativos, reflejando la inactivación transcripcional aleatoria del transgén integrado en esta progeñie clonal homogénea fenotípica.

65

Ejemplo 13

Los vectores de VIH que contienen una versión delecionada de la región U3 de la LTR y un EF1 α interno son sistemas más potentes para la transducción de células madre hematopoyéticas

5 En la figura 9, se compara la capacidad de varios vectores derivados del VIH-1, incluyendo la secuencia de triple hélice de ADN, para transducir células CD34+ de sangre del cordón umbilical humano. Se analizó el efecto de la deleción de la mayoría de la región U3 de la LTR en 3' sobre la transducción de GFP y la expresión en células CD34+. Se realizó la comparación de vectores que contienen una LTR de VIH-1 intacta o una versión delecionada de un U3 en el contexto de un promotor interno de CMV o un promotor interno de EF1 α (Kim *et al.*, 1990) para activar la expresión del gen indicador de GFP. Se realizaron todos los experimentos de transducción usando la misma concentración de partículas de vector (500 ng de P24/ml) tras la normalización de las reservas de vectores usando un ensayo ELISA disponible comercialmente para el antígeno de VIH-1 (Dupont) P24 (proteína cápsida). Se realizaron análisis por citometría de flujo (FACS) o bien a las 48 horas (figura 9A) o bien a las 120 horas (figuras 9B) tras el periodo de transducción de 24 horas.

De forma interesante, la deleción de la región U3 de la LTR en vectores VIH-1 induce un ligero aumento en el porcentaje de células positivas para GFP en todos los casos. Este aumento fue modesto cuando se analizó a las 48 horas. En este momento, un mecanismo de pseudotransducción podía ser responsable de una fracción de las células positivas para GFP. La pseudotransducción es la administración directa de proteínas GFP a células diana mediante la partícula de vector retroviral de fusión, sin necesidad de una integración real del genoma del vector retroviral. El aumento en el porcentaje de GFP positiva tras la transducción mediante versiones con U3 delecionada de los vectores de VIH-1 se hizo más evidente a las 120 horas tras la transducción (figura 9B). En este momento, se observó un aumento de hasta dos veces en el porcentaje de células positivas para GFP tras la transducción por el vector TRIP AU3- EF1 α -GFP cuando se compara con los resultados obtenidos con el vector equivalente pero que contiene una LTR de VIH-1 intacta.

De forma más importante, la deleción de la región U3 de la LTR del VIH-1 en los vectores de triple hélice del VIH-1 indujo una mejor expresión de la proteína indicadora GFP. La media de la intensidad de la fluorescencia en CMH humanas transducidas cuando se analizó mediante FACS fue siempre superior en un factor de tres a un cinco veces en el caso de las versiones con U3 delecionada que con vectores que contenían una LTR de VIH-1 intacta. Se observó este beneficio de la expresión de GFP tanto si se usaron los promotores de CMV como de EF1 α como promotor interno en el constructo del vector de VIH-1. No se conoce el mecanismo molecular que explica esta expresión potenciada de proteínas GFP en células transducidas. Alguna secuencia en la LTR de VIH-1 puede influenciar negativamente la expresión activada mediante el promotor interno. Alternativamente, una transcripción basal iniciada en la LTR de VIH-1 puede interferir con la iniciación de la transcripción en el promotor interno.

Este estudio también muestra que el promotor de EF1 α es un mejor promotor en CMH humanas que el promotor de CMV. En la figura 9B, la media de la intensidad de la fluorescencia de GFP es de tres a cinco veces mejor en el caso del promotor de EF1 α que en el caso del promotor de CMV.

Bibliografía

Toda la bibliografía citada en el presente documento se incorpora en el mismo en su totalidad como referencia.

45 **Barbosa, P., Charneau, P., Durney, N., and Clavel, F. (1994).** Kinetic analysis of HIV-1 early replicative steps in a coculture system. *AIDS Research & Human Retroviruses*. 10, 53-59.

50 **Bonnerot, C., Rocancourt, D., Briand, P., Grimber, G., and Nicolas, j. (1987).** A beta-galactosidase hybrid protein targeted to nuclei as a marker for development studies. *Proc. Natl. Acad. of Sci. USA* 84, 6795-9.

Borroto-Esoda, K., and Boone, L. (1991). Equine infectious anemia virus and human immunodeficiency virus DNA synthesis *in vitro*: characterization of the endogenous reverse transcriptase reaction. *Journal of Virology* 65, 1952-1959.

55 **Bowerman, B., Brown, P., Bishop, J., and Varmus, H. (1989).** A nucleoprotein complex mediates the integration of retroviral DNA. *Genes and Development* 3, 469-78.

60 **Bukrinskaya, A., Brichacek, B., Mann, A., and Stevenson, M. (1998).** Establishment of a functional human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcription complex involves the cytoskeleton. *Journal of Experimental Medicine* 188, 2113-25.

65 **Bukrinsky, M. L., Sharova, N., Dempsey, M. P., Stanwick, T. L., Bukrinskaya, A. G., Haggerty, S., and Stevenson, M. (1992).** Active nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes. *Proc Natl Acad Sci* 89, 6580-6584.

Bukrinsky, M., Sharova, N., McDonald, T., Pushkarskaya, T., Tarpley, W., and Stevenson, M. (1993a). Association of integrase, matrix, and reverse transcriptase antigens of human immunodeficiency virus type 1 with viral nucleic acids following acute infection. *Proc. Natl. Acad. of Sci. USA* 90, 6125-9.

ES 2 280 250 T3

- Bukrinsky, M. I., Haggerty, S., Dempsey, M. P., Sharova, N., Adzhubel, A., Spitz, L., Lewis, P., Goldfarb, D., Emerman, M. and Stevenson M (1993b).** A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells. *Nature* 365, 666-669.
- 5 **Case SS. Price MA. Jordan CT. Yu XJ. Wang L. Bauer G. Haas DL. Xu D. Stripecke R. Naldini L. Kohn DB. Crooks GM.** Stable transduction of quiescent CD34(+)/CD38(-) human hematopoietic cells by HIV-1-based lentiviral vectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96(6):2988-93, 1999.
- 10 **Charneau, P., and Clavel, F. (1991).** A single-stranded gap in human immunodeficiency virus unintegrated linear DNA defined by a central copy of the polypurine tract. *Journal of Virology* 65, 2415-2421.
- Charneau, P., Alizon, M., and Clavel, F. (1992).** A second origin of plus strand synthesis is required for optimal HIV replication. *Journal of Virology* 66, 2814-2820.
- 15 **Charneau, P., Mirambeau, G., Roux, P., Paulous, S., Buc, H., and Clavel, F. (1994).** HIV-1 reverse transcription: a termination step at the center of the genome. *Journal of Molecular Biology* 241, 651-662.
- Croisille, L. et al. (1994).** Hydrocortisone differentially affects the ability of murine stromal cells and human marrow-derived adherent cells to promote the differentiation of Cd34+/CD38-long-term cultureinitiating cells. *Blood* 84: 4116-4124.
- 20 **Dworetzky, S., Lanford, R., and Feldherr, C. (1988).** The effects of variations in the number and sequence of targeting signals on nuclear uptake. *Journal of Cell Biology* 107, 1279-87.
- 25 **Emerman, M., Bukrinski, M., and Stevenson, M. (1994).** HIV-1 infection of non-dividing cells, reply to Freed EO and Martin MA. *Nature* 369, 108.
- Evans et al., (june 10, 1999).** *Hum Gene Therapy* 10(9):1479-89.
- 30 **Farnet, C., and Haseltine, W. (1990).** Integration of human immunodeficiency virus type 1 DNA *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. of Sci. USA* 87, 4164-8.
- Fouchier, R. A., Meyer, B. E., Simon, J. H. Fischer, U., and Malim, M. H. (1997).** HIV-1 infection of nondividing cells: evidence that the amino-terminal basic region of the viral matrix protein is important for Gag processing but not for post-entry nuclear import. *EMBO Journal* 16, 4531-4539.
- 35 **Freed, E. O., and Martin, M. A. (1994).** HIV-1 infection of non-dividing cells. *Nature* 369, 107-108.
- Freed, E. O., Englund, G., and Martin, M. A. (1995).** Role of the basic domain of human immunodeficiency virus type 1 matrix in macrophage infection. *Journal of Virology* 69, 3949-3954.
- 40 **Freed, E. O., Englund, G., Maldarelli, F., and Martin, M. A. (1997).** Phosphorylation of residue 131 of HIV-1 matrix is not required for macrophage infection. *Cell* 88, 171-173.
- 45 **Gallay, P., Swingler, S., Aiken, C., and Trono, D. (1995a).** HIV-1 infection of non dividing cells: C-terminal tyrosine phosphorylation of the viral matrix protein as a key regulator. *Cell* 80, 379-388.
- Gallay, P., Swingler, S., Song, J., Bushman, F., and Trono, D. (1995b)** HIV nuclear import is governed by the phosphotyrosine-mediated binding of matrix to the core domain of integrase. *Cell* 83, 569-576.
- 50 **Gallay, P., Hope, T., Chin, D., and Trono, D. (1997).** HIV-1 infection of nondividing cells through the recognition of integrase by the importin/karyopherin pathway. *Proc. Natl. Acad. of Sci. USA* 94, 9825-9830.
- Gartner, S., Markovits, P., Marcovitz, D. M., Kaplan, M. H., Gallo, R. C., and Popovic, M. (1986).** The role of mononuclear phagocytes in HTLV-III/LAV infection. *Science* 233, 215-219.
- 55 **Gelderblom, H. (1991).** Assembly and morphology of HIV: potential effect of structure on viral function. *AIDS* 5, 617-37.
- 60 **Gulizia, J., Dempsey, M., Sharova, N., Bukrinsky, M., Spitz, L., Goldfarb, D., and Stevenson, M. (1994).** Reduced nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes in the presence of a prototypic nuclear targeting signal. *Journal of Virology* 68, 2021-5.
- Hagstrom, J., Ludtke, J., Bassik, M., Sebestyen, M., Adam, S., and Wolff, J. (1997).** Nuclear import of DNA in digitonin-penneabilized cells. *Journal of Cell Science* 110, 2323-31.
- 65 **Hamm, J., and Mattaj, I. (1990).** Monomethylated cap structures facilitate RNA export from the nucleus. *Cell* 63, 109-18.

ES 2 280 250 T3

- Harada, S., Koyanagi, Y., and Yamamoto, N.** (1985). Infection of HTLV-III/LAV in HTLV-1-carrying cells MT-2 and MT-4 and application in a plaque assay. *Science* 229, 563-6.
- Harris, J. D., Scott, J. V., Traynor, B., Brahic, M., Stowring, L., Ventura, P., Haase, A. T., and Peluso, R.** (1981). Visna virus DNA: discovery of a novel gapped structure. *Virology*, 573-583.
- Heinzinger, N., Bukinsky, M., Haggerty, S., Ragland, A., Kewalramani, V., Lee, M., Gendelman, H., Ratner, L., Stevenson, M., and Emerman, M.** (1994). The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proc. Natl. Acad. of Sci. USA* 91, 7311-5.
- Ho, D., Rota, T., and Hirsch, M.** (1986). Infection of monocyte/macrophages by human T lymphotropic virus type III. *Journal of Clinical Investigation* 77, 1712-1715.
- Huber, H. E., and Richardson, C. C.** (1990). Processing of the primer for plus strand DNA synthesis by human immunodeficiency virus 1 reverse transcriptase. *Journal of Biological Chemistry* 265, 10565-10573.
- Hungnes, O., Tjotta, E., and Grinde, B.** (1992) Mutations in the central polypurine tract of HIV-1 result in delayed replication. *Virology* 190, 440-2.
- Issaad, C. et al.** (1993). A murine stromal cell line allows the proliferation of very primitive human CD34+/CD38- progenitor cells in long-term cultures and semisolid assays. *Blood* Vol. 81, No 11: pp 2916-2924.
- Kalderon, D., Roberts, B., Richardson, W., and Smith, A.** (1984). A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* 39, 499-509.
- Karageorgos, L., Li, P., and Burrell, C.** (1993). Characterisation of HIV replication complexes early after cell to cell infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 9, 817-823.
- Kim DW, Uetsuki T, Kaziro Y, Yamaguchi N, Sugano S.** Use of the human elongation factor 1 alpha promoter as a versatile and efficient expression system. *Gene*, 1990, 91: 217-223.
- Klarmann, G., Schaubert, C., and Preston, B.** (1993). Template-directed pausing of DNA synthesis by HIV-1 reverse transcriptase during polymerization of HIV-1 sequences *in vitro*. *Journal of Biological Chemistry*. 268, 9793-802.
- Koostra, N., and Schuitemaker, H.** (1999). Phenotype of HIV-1 lacking a functional nuclear localization signal in matrix protein of gag and Vpr is comparable to wild-type HIV-1 in primary macrophages. *Virology* 253,170-80.
- Kunkel, T.** (1985). Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc. Natl. Acad. of Sci. USA* 82, 488-92.
- Lanford, R., and Butel, J.** (1984). Construction and characterization of an SV40 mutant defective in nuclear transport of T antigen. *Cell* 37, 801-13.
- Lavigne, M., Roux, P., Buc, H., and Schaeffer, F.** (1997). DNA curvature controls termination of plus strand DNA synthesis at the centre of HIV-1 genome. *Journal of Molecular Biology* 266, 507-524.
- Lewis, P., Hensel, M., and Emerman, M.** (1992). Human immunodeficiency virus infection of cells arrested in the cell cycle. *EMBO Journal* 11, 3053-3058.
- Lori, F., di Marzo Veronese, F., de Vico, A., Lusso, P., Reitz, M. J., and Gallo, R.** (1992). Viral DNA carried by human immunodeficiency virus type 1 virions. *J. Virol.* 66, 5067-5074.
- Miller, M., Farnet, C., and Hushman, F.** (1997). Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. *Journal of Virology* 71, 5382-90.
- Miyoshi H, Smith KA, Mosier DE, Verma IM, Torbett BE.** (Jan 29, 1999). Transduction of human CD34+ cells that mediate long-term engraftment of NOD/SCID mice by HIV vectors. *Science* 283(5402): 682-6.
- Naldini, L., Blomer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F., Verma, I., and Trono, D.** (1996). *In vivo* gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272, 263-7.
- Panet, A., Baltimore, D., and Hanafusa, H.** (1975). Quantitation of avian RNA tumor virus reverse transcriptase by radioimmunoassay. *J. Virol.* 16, 146-152.
- Pflumio, F. et al.** (1996). Phenotype and function of human hematopoietic cells engrafting immune-deficient CB17-severe combined immunodeficiency mice and nonobese diabetic-severe combined immunodeficiency mice after transplantation of human cord blood mononuclear cells. *Blood* 88: 3731-3740.

ES 2 280 250 T3

Popov, S., Rexach, M., Zybarth, G., Reiling, N., Lee, M. A., Ratner, L., Lane, C. M., Moore, M. S., Blobel, G., and Bukrinsky, M. (1998). Viral protein R regulates nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex. *EMBO Journal* 17, 909-917.

5 **Poznansky, M., Lever, A., Bergeron, L., Haseltine, W., and Sodroski, J. (1991).** Gene transfer into human lymphocytes by a defective human immunodeficiency virus type I vector. *Journal of Virology* 65, 532-6.

Robin, C. et al. (1999). Identification of T-lymphoid progenitor cells in CD34+CD38low and CD34+CD38+ subsets of human cord blood and bone marrow cells using NOD-SCID fetal thymus organ cultures. *Br J Haematol* 104: 809-819.

Roe, T. Y., Reynolds, T. C., Yu, G., and Brown, P. O. (1993). Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. *EMBO J* 12, 2099-2108.

15 **Stetor, S., Rausch, J., Guo, M., Burnham, J., Boone, L., Waring, M., and Le Grice, S. (1999).** Characterization of (+) strand initiation and termination sequences located at the center of the equine infectious anemia virus genome. *Biochemistry* 38, 3656-67.

Thormar, H. (1963). The growth cycle of Visna virus in monolayer cultures of sheep cells. *Virology* 19, 273-278.

20 **Uchida et al. (Sep 29, 1998).** *PNAS USA* 95(20): 11939-44.

Von Schwedler, U., Kombluth, R., and Trono, D. (1994). The nuclear localization signal of the matrix protein of human immunodeficiency virus type 1 allows the establishment of infection in macrophages and quiescent T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. of Sci. USA* 91, 6992-6.

Weinberg, J. B., Matthews, T.J., Cullen, B. R., and Malim, M. H. (1991). Productive human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection of nonproliferating human monocytes. *Journal of Experimental Medicine* 174, 1477-1482.

30 **Whittaker, G., and Helenius, A. (1998).** Nuclear import and export of viruses and virus genomes. *Virology* 246, 1-23.

Yee, J., Miyanochara, A., LaPorte, P., Bouic, K. Burns, J., and Friedmann, T. (1994). A general method for the generation of high-titer, pantropic retroviral vectors: highly efficient infection of primary hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. of Sci. USA* 91, 9564-8.

40

45

50

55

60

65

ES 2 280 250 T3

REIVINDICACIONES

1. Vector de expresión de VIH-1 que comprende:

5 a) un ácido nucleico purificado o aislado que comprende al menos una copia de las regiones que actúan en cis cPPT y CTS de un retrovirus, en el que dichas regiones cPPT y CTS inducen una estructura de ADN de tres cadenas y

b) una secuencia de ácido nucleico heteróloga,

10 en el que el LTR del VIH-1 se deleciona para el promotor y el potenciador de U3.

2. Vector según la reivindicación 1, en el que dicho ácido nucleico que comprende al menos una copia de las regiones cPPT y CTS es de un lentivirus.

15 3. Vector según la reivindicación 2, en el que dicho ácido nucleico que comprende al menos una copia de las regiones cPPT y CTS es del virus de inmunodeficiencia humana (VIH).

20 4. Vector según la reivindicación 3, en el que dicho ácido nucleico que comprende al menos una copia de las regiones cPPT y CTS es del VIH-1 o VIH-2.

5. Vector según la reivindicación 2, en el que dicho ácido nucleico que comprende al menos una copia de las regiones cPPT y CTS es de VISNA, VAIE, VIF, o VAEC.

25 6. Vector según la reivindicación 1 a 5, que comprende una única copia de las regiones cPPT y CTS del retrovirus.

7. Vector según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la secuencia de ácido nucleico heteróloga está funcional o físicamente unida al ácido nucleico que comprende al menos una copia de las regiones cPPT y CTS.

30 8. Vector según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la secuencia de ácido nucleico heterólogos codifica para un péptido, polipéptido o proteína.

35 9. Vector según la reivindicación 8, que contiene una copia de las regiones que actúan en cis cPPT-CTs, el gen indicador GFP bajo el control del promotor EF1 α , y la secuencia U3 de un LTR, carente de su promotor y potenciador, y que es pTRIP Δ U3 EF1 α GFP.

10. Vector según la reivindicación 8, en el que la secuencia de ácido nucleico heterólogos codifica para una proteína terapéutica.

40 11. Célula recombinante que comprende un vector de expresión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

12. Célula recombinante según la reivindicación 11, en la que la célula es una célula HeLa o una célula hematopoyética.

45 13. Célula recombinante según la reivindicación 11, que es una célula madre hematopoyética.

50 14. Procedimiento *in vitro* para insertar una secuencia de ácido nucleico heteróloga en el núcleo de la célula diana, comprendiendo dicho método exponer un vector de expresión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en condiciones que permiten la captación de dicha secuencia de ácido nucleico heteróloga en la célula diana.

15. Procedimiento según la reivindicación 14, en el que la eficacia de la inserción del ácido nucleico de interés en el núcleo de la célula diana es del 30% o superior.

55 16. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 15, en el que el ácido nucleico heterólogo codifica para un péptido, polipéptido, o proteína.

17. Procedimiento según la reivindicación 16, en el que la proteína es una proteína terapéutica.

60 18. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17, en el que la célula diana es una célula que no se divide.

19. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17, en el que la célula diana es una célula HeLa o célula hematopoyética.

65 20. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17, en el que la célula diana es una célula madre hematopoyética.

ES 2 280 250 T3

21. Procedimiento para expresar una secuencia de ácido nucleico heteróloga *in vitro*, comprendiendo dicho proceso:

5 a) exponer células diana a un vector de expresión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en condiciones que permiten la captación del vector que contiene la secuencia de ácido nucleico heteróloga en la célula diana para crear una célula recombinante, y

b) cultivar la célula recombinante en condiciones en las que se expresa la secuencia de ácido nucleico heteróloga.

10 22. Procedimiento según la reivindicación 21, en el que se expresa la secuencia de ácido nucleico heteróloga en cultivos tisulares.

15 23. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 22, que comprende además purificar o aislar el producto de expresión de la secuencia de ácido nucleico heteróloga.

24. Célula recombinante que comprende un vector de expresión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para su uso como compuesto terapéutico para permitir a la célula recombinante expresar el ácido nucleico en el cuerpo del individuo.

20 25. Célula recombinante según la reivindicación 24, para su uso como compuesto terapéutico en una célula madre hematopoyética.

26. Vector de expresión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para su uso como compuesto terapéutico, en el que el ácido nucleico está en una cantidad y forma suficientes para dar como resultado la expresión del gen de interés en el cuerpo del individuo.

27. Vector según la reivindicación 26, **caracterizado** porque se expresa en un tejido diana.

30 28. Vector de expresión de VIH-1 que comprende:

a) un ácido nucleico aislado o purificado que comprende al menos una copia de las regiones que actúan en *cis* cPPT y CTS de un retrovirus, en el que dichas regiones cPPT y CTS inducen una estructura de ADN de tres cadenas y

35 b) una secuencia de ácido nucleico heteróloga,

en el que se deleciona el LTR del VIH-1 para el promotor y el potenciador de U3, para su uso en el tratamiento de un individuo que padece, o tiene una alta probabilidad de desarrollar, una enfermedad o trastorno que tiene una base genética, en el que dicho vector retroviral está en una cantidad suficiente para dar como resultado la expresión de dicha proteína terapéutica en una cantidad suficiente para tratar dicha enfermedad o trastorno.

40 29. Vector según la reivindicación 28, para su uso como fármaco en un tratamiento profiláctico, paliativo o curativo.

30. Vector según la reivindicación 29, para su uso en el tratamiento de enfermedades o trastornos sanguíneos, una enfermedad o trastorno del sistema nervioso o cerebro, o una enfermedad o trastorno congénito.

45 31. Kit que contiene al menos un recipiente que contiene un vector de expresión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

50 32. Kit según la reivindicación 31, en el que la secuencia de ácido nucleico heteróloga codifica para una proteína terapéutica.

55

60

65

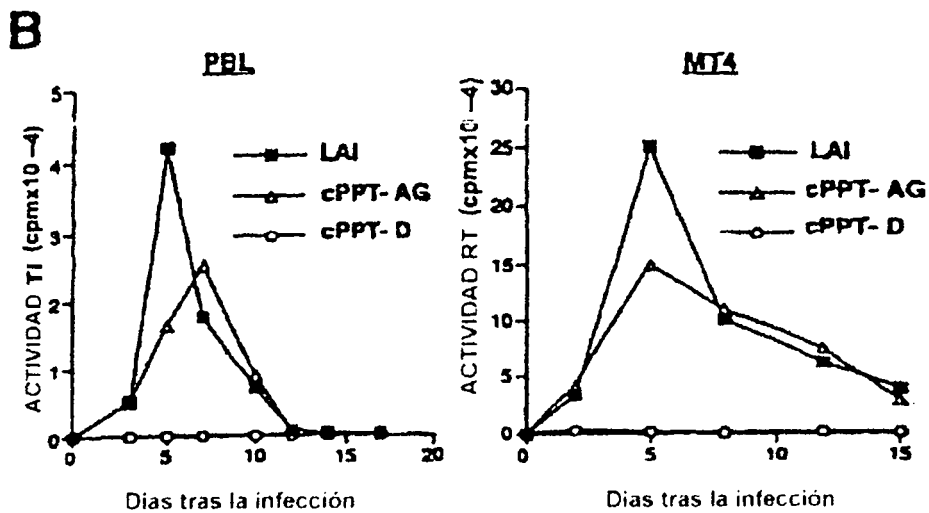


FIG. 18

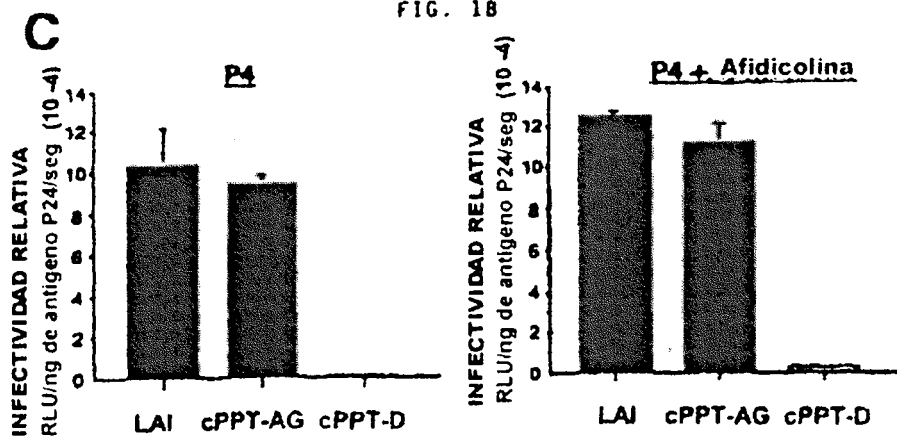


FIG. 10

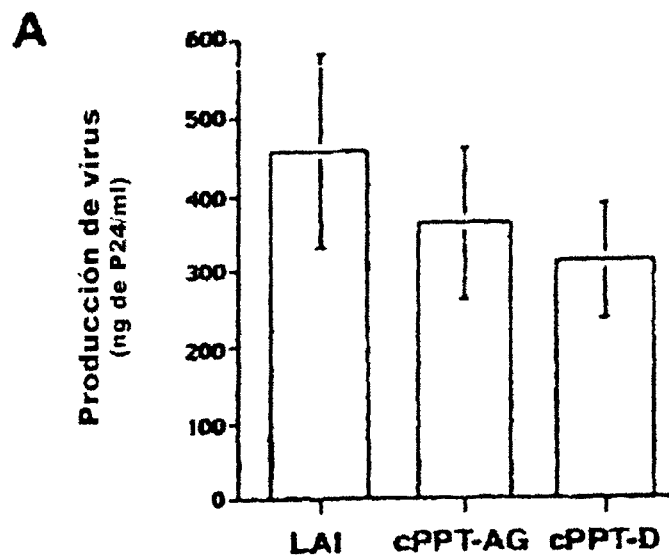


FIG. 2A

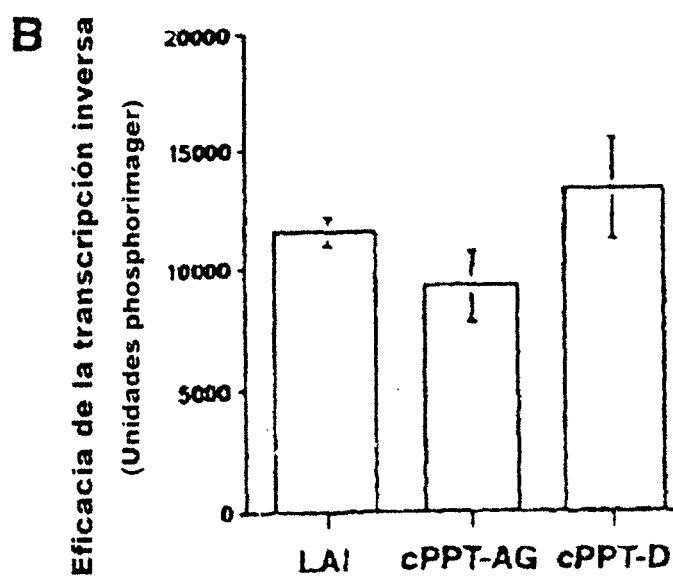


FIG. 2B

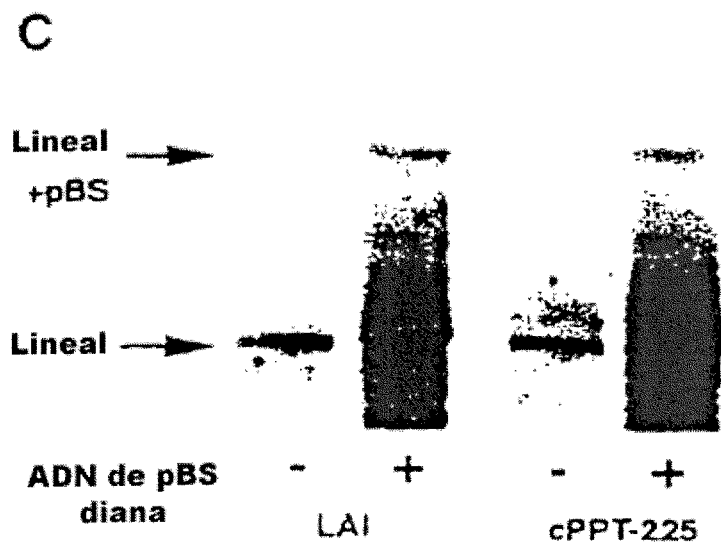


FIG. 2C

FIG. 3A

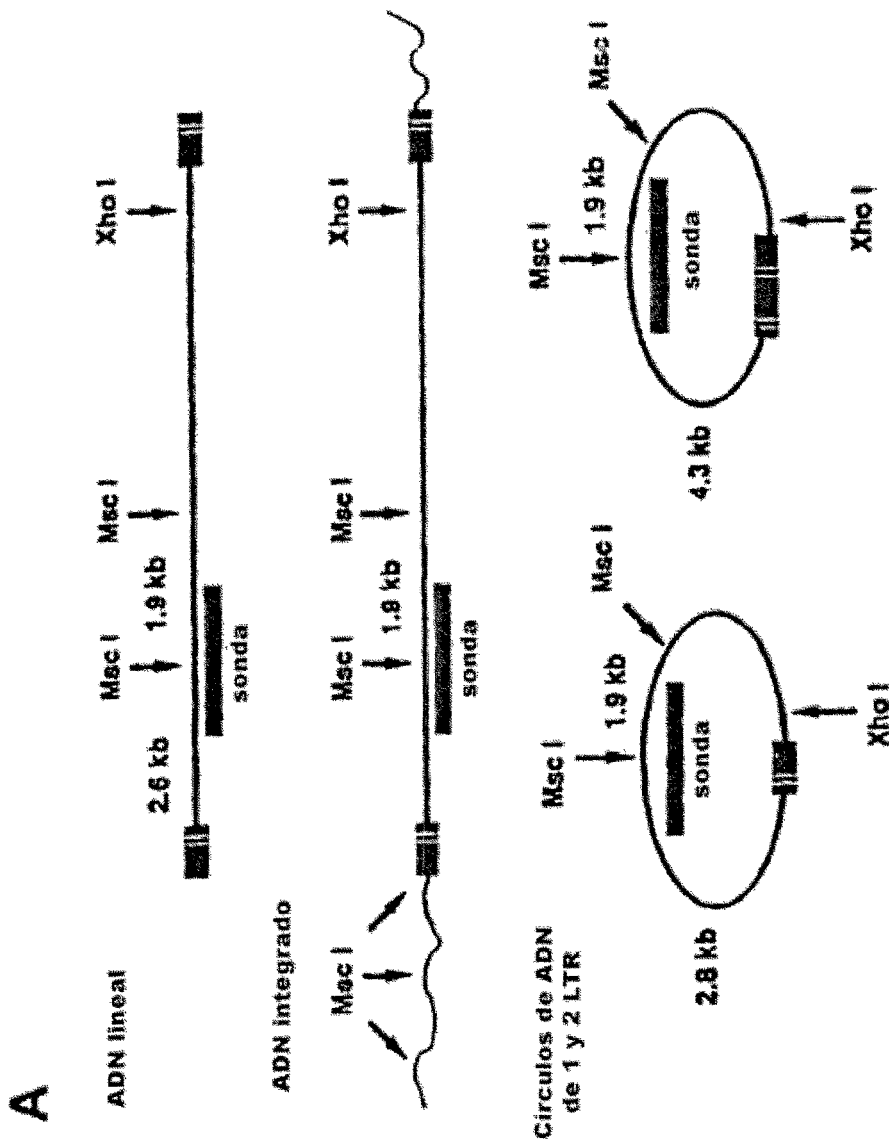


FIG. 38

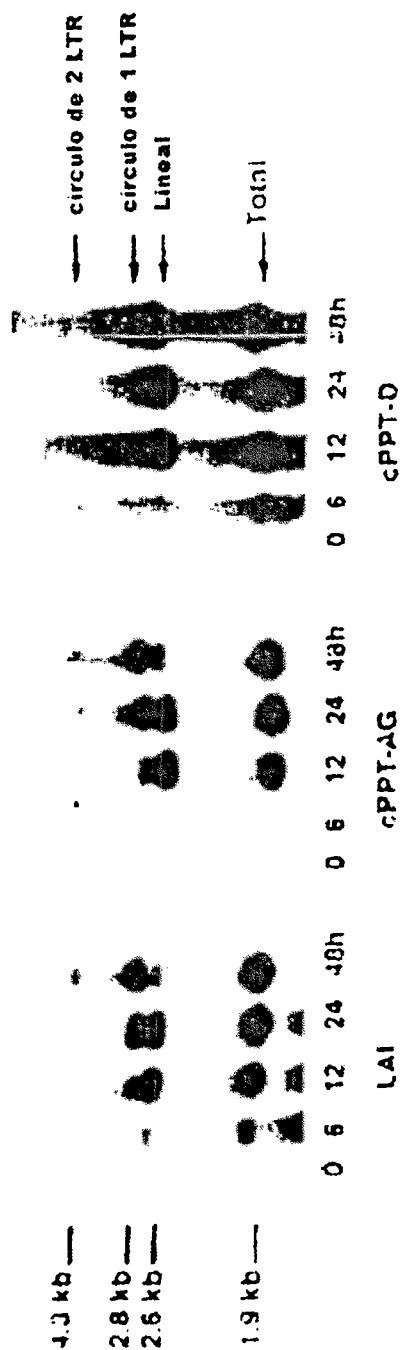
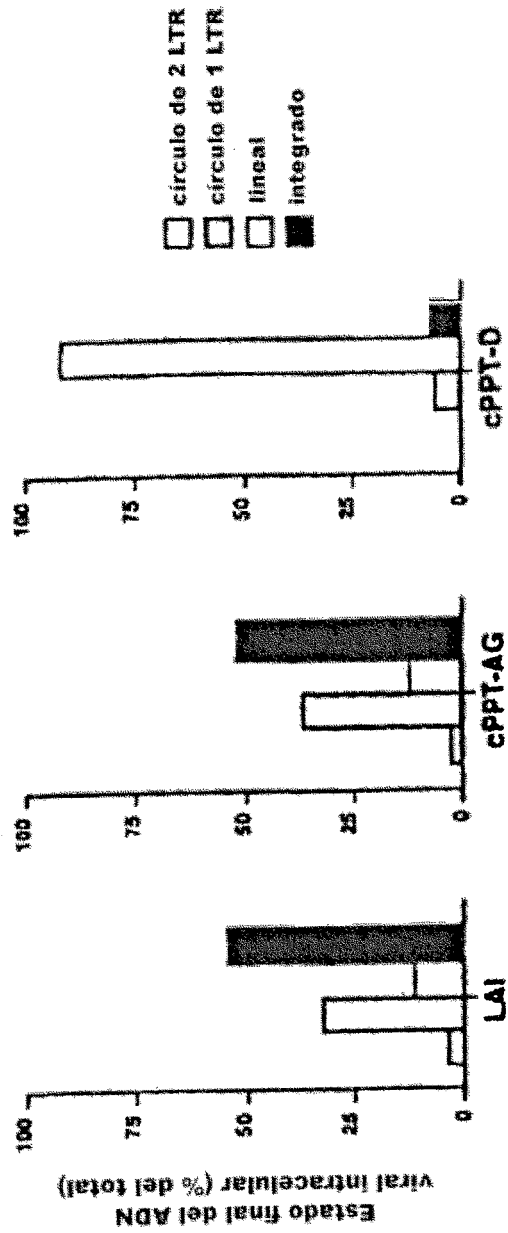


FIG. 3C

C



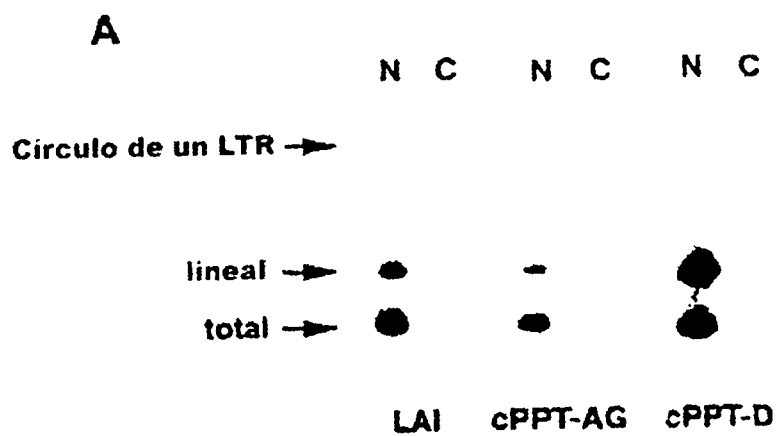


FIG. 4A

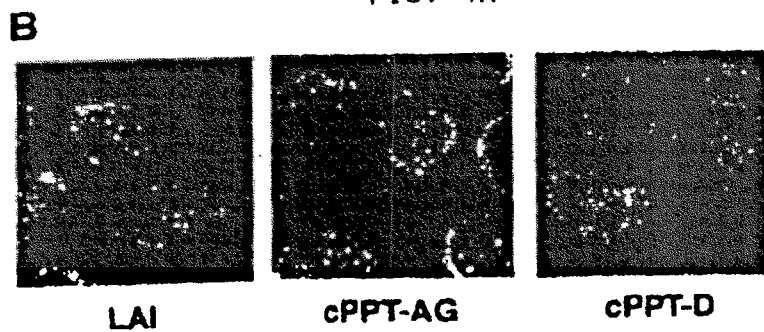


FIG. 4B

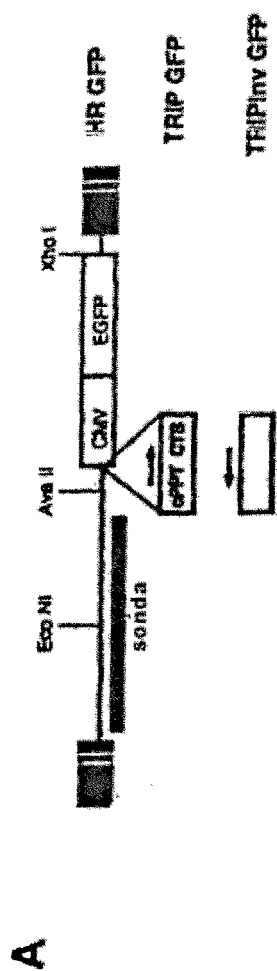


FIG. 5A

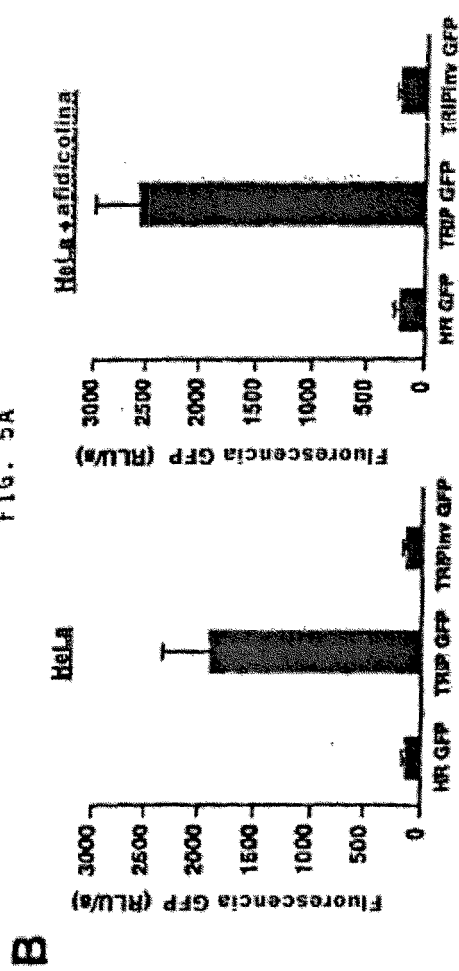


FIG. 5B

FIG. 5C

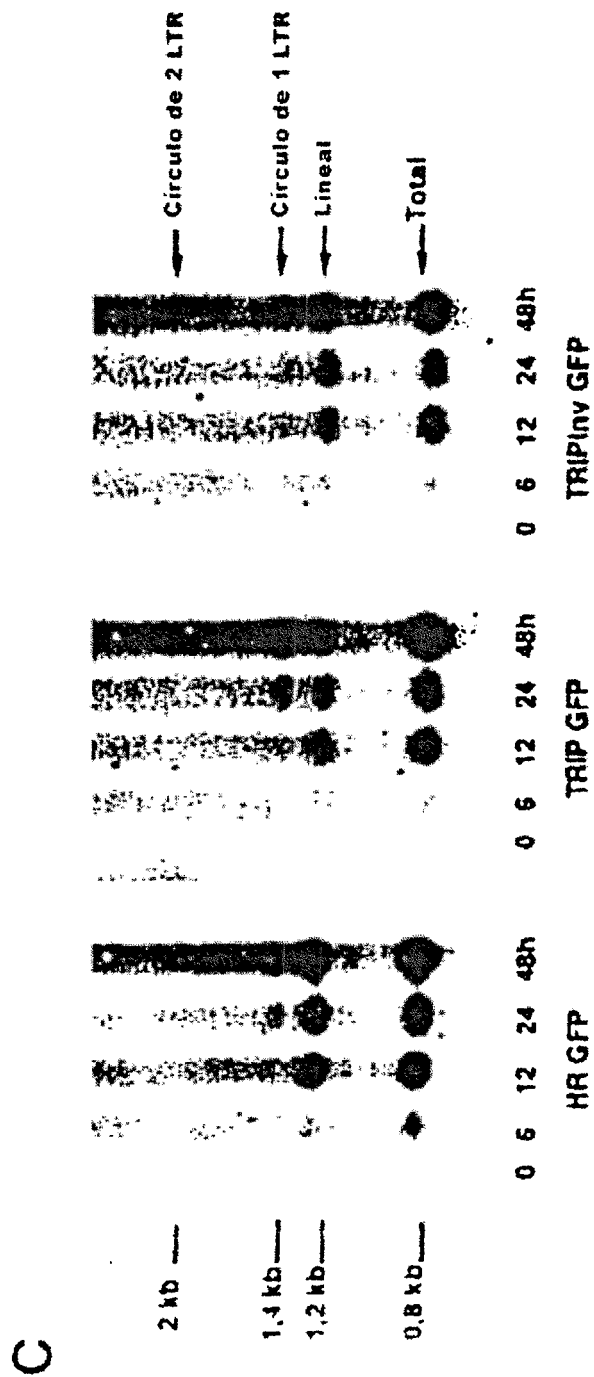
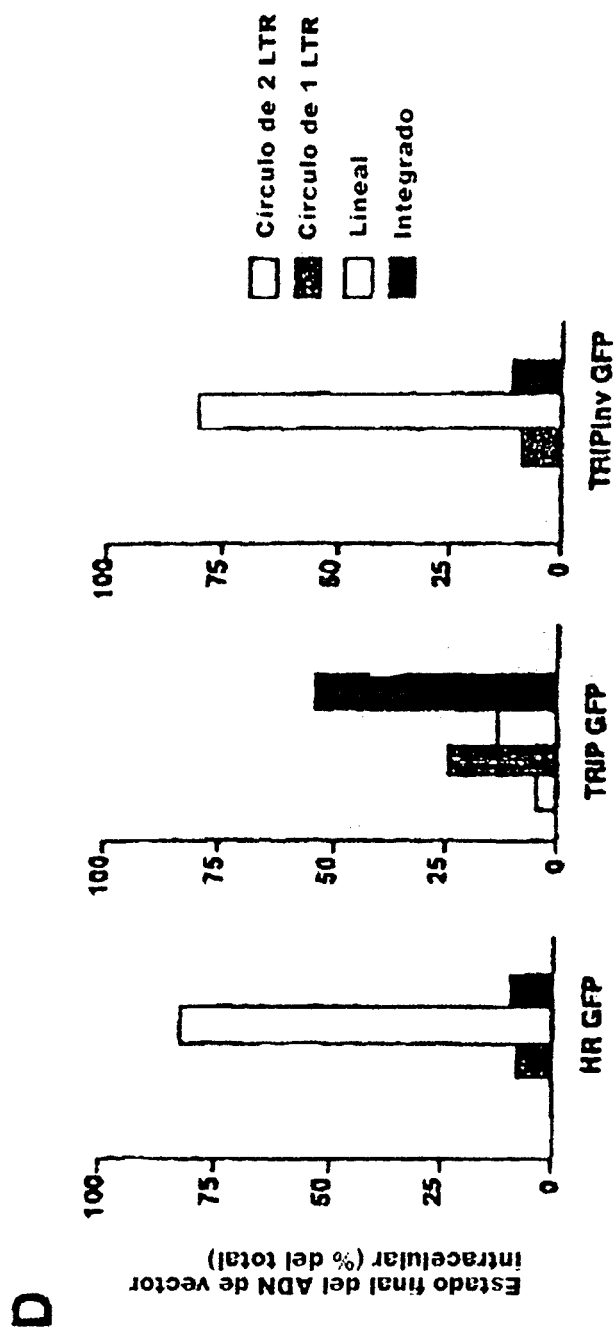
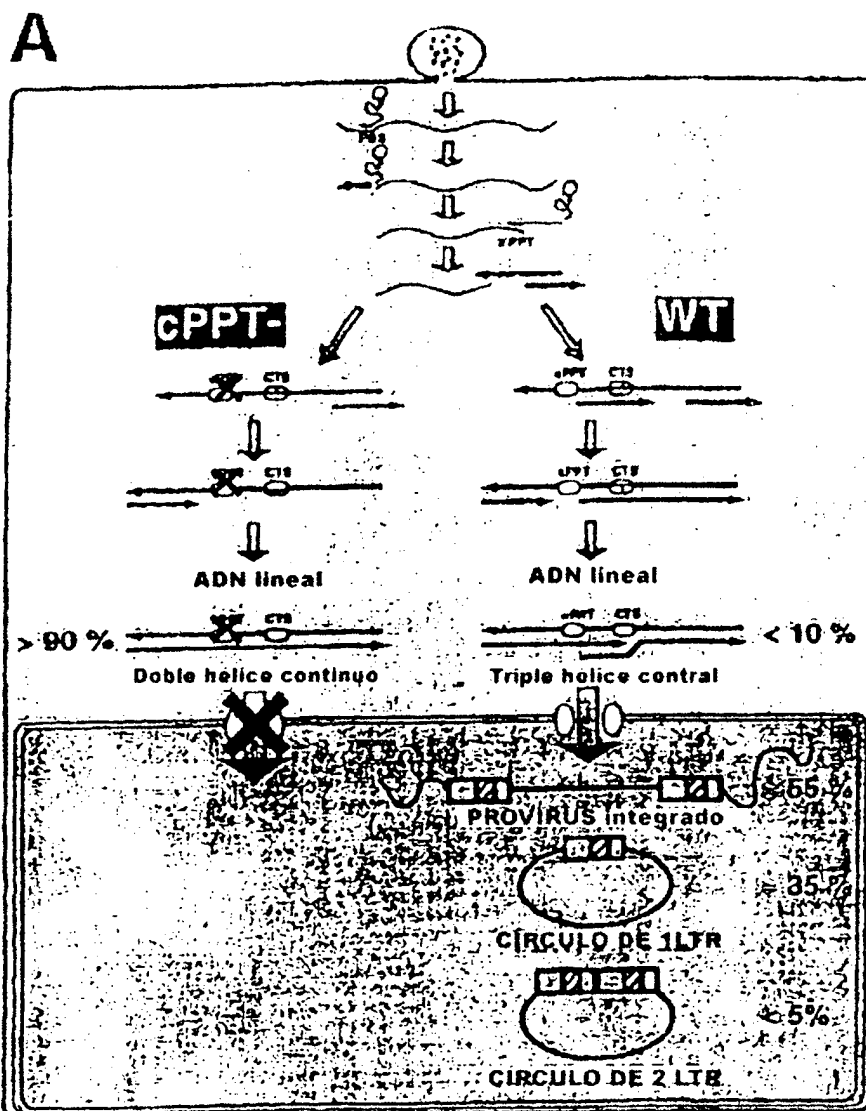


FIG. 5D





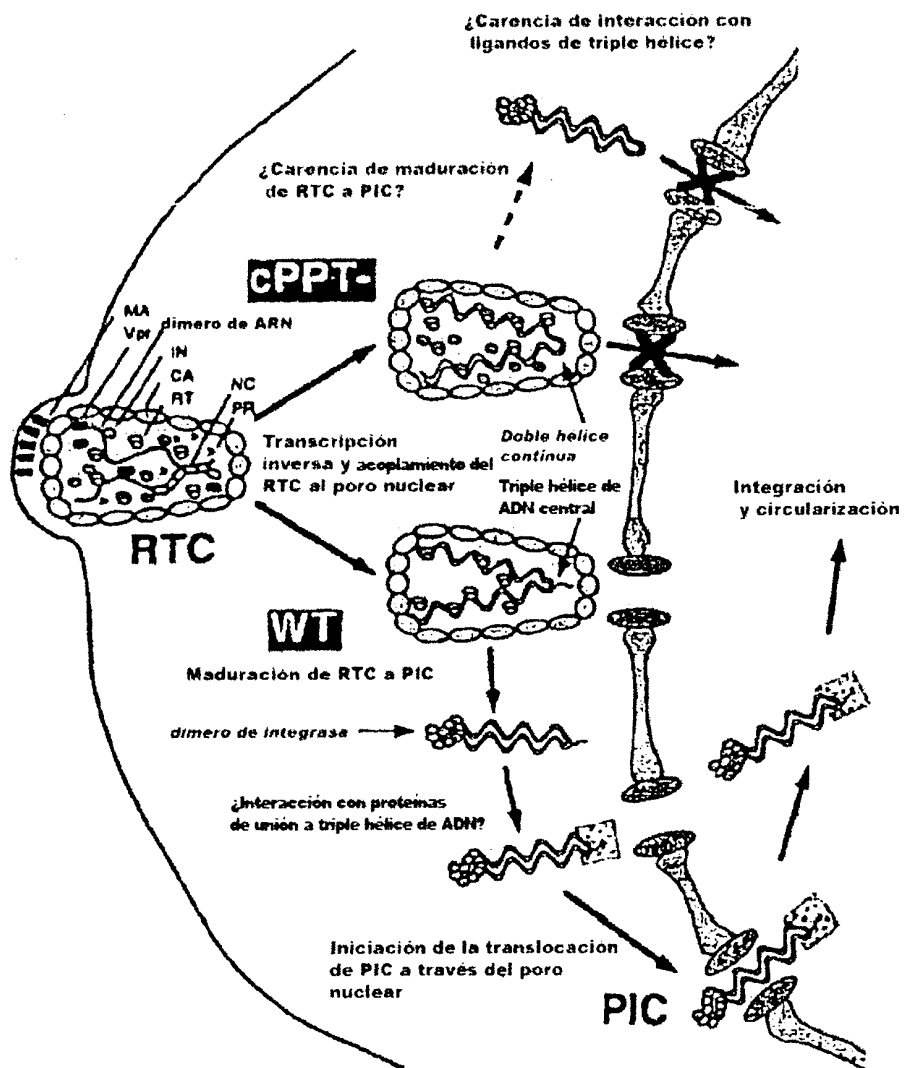


FIG. 68

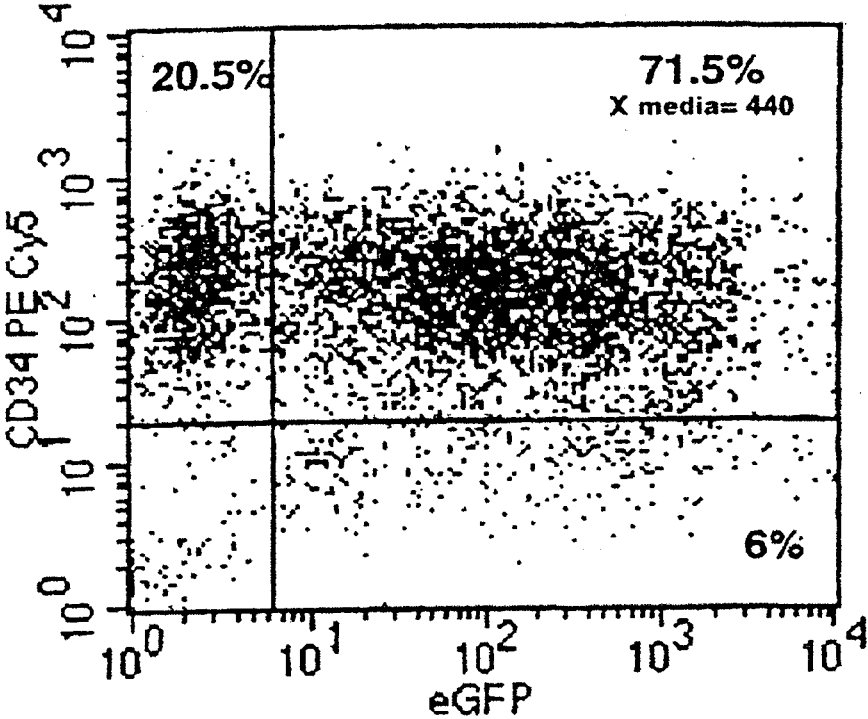


FIG. 7A

**TRANSDUCCIÓN DE CÉLULAS MADRE CDD34+
MEDIANTE VECTORES DE TRIPLE HÉLICE VIH**

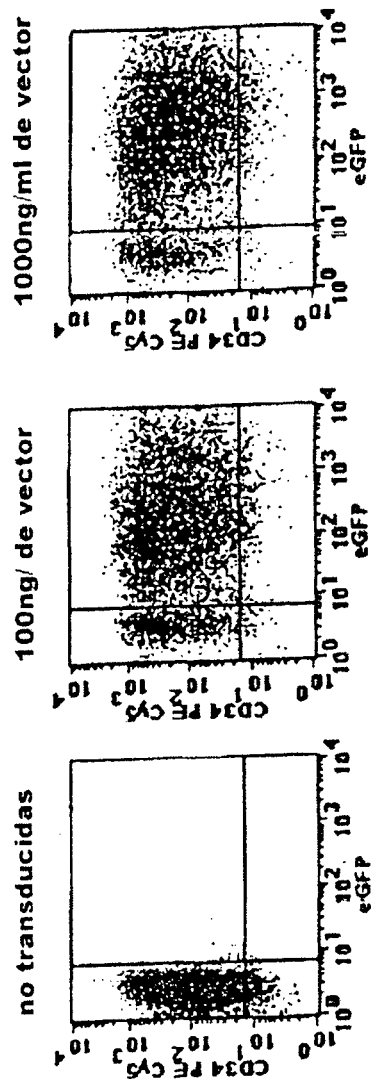


FIG. 7B

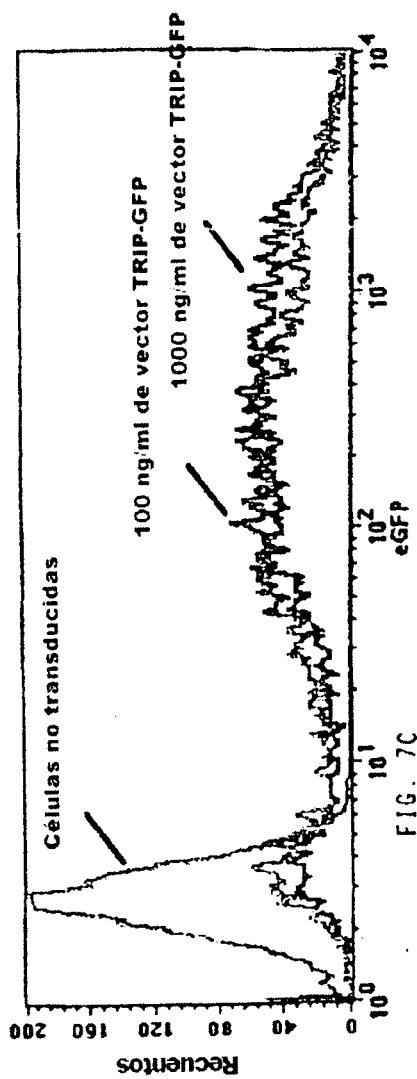
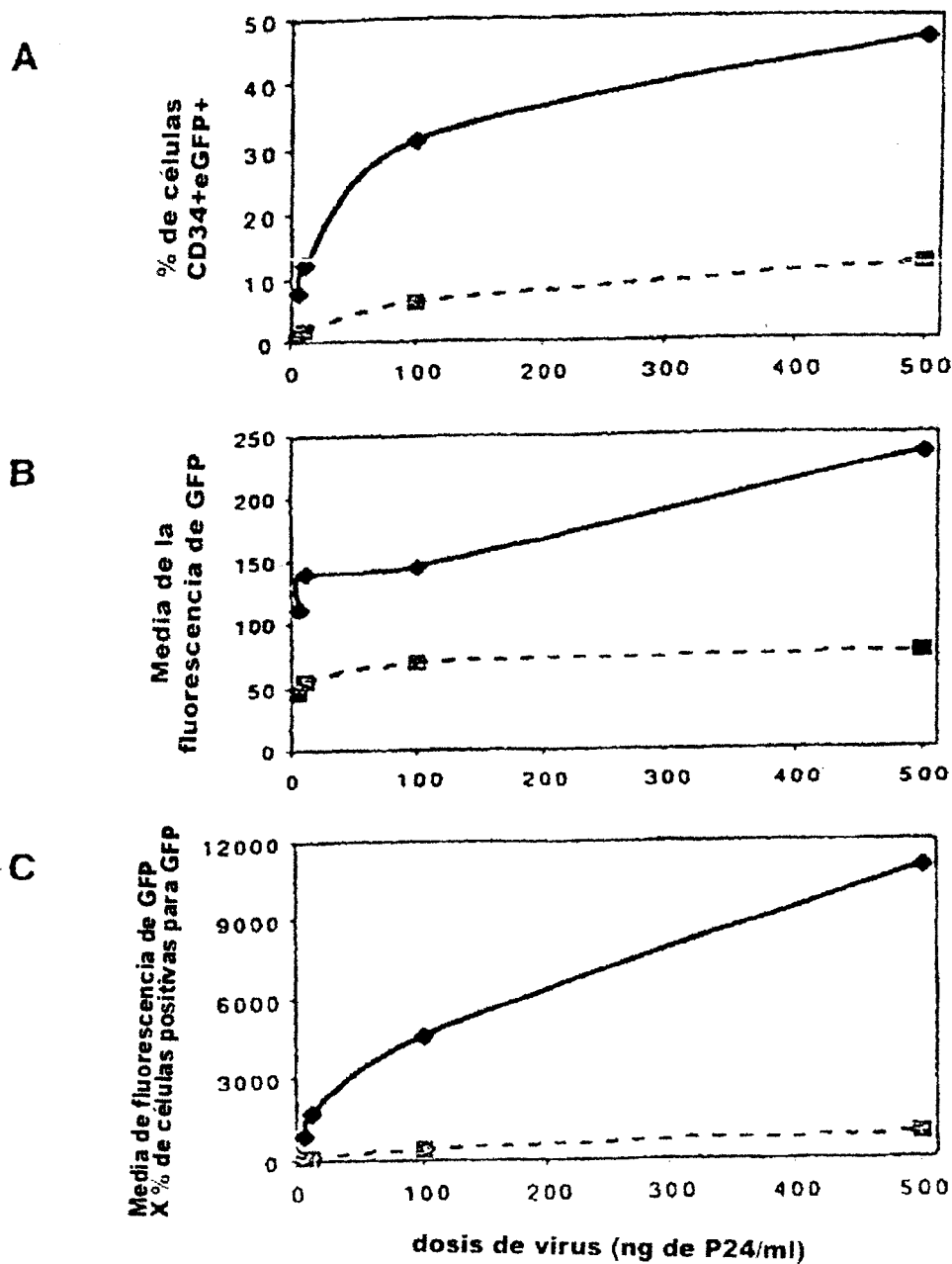


FIG. 7C

FIG. 8



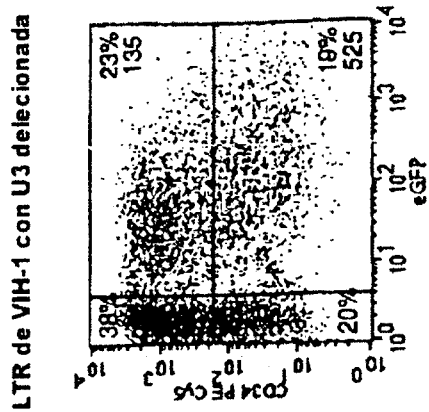


FIG. 9A(2)

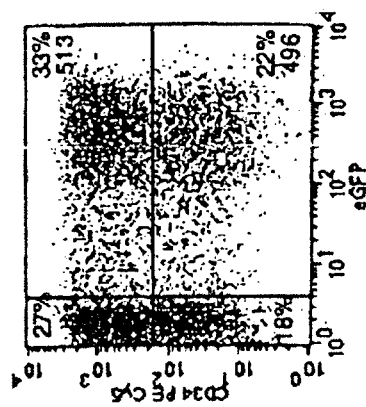


FIG. 9A(4)

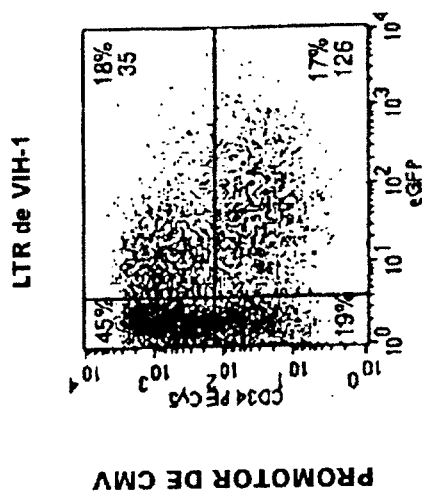


FIG. 9A(1)

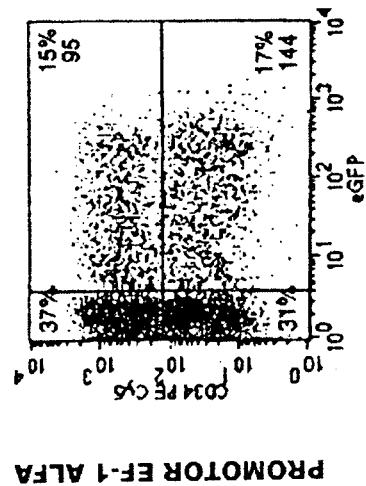


FIG. 9A(3)

LTR de VIH-1 con U3 deletcionada

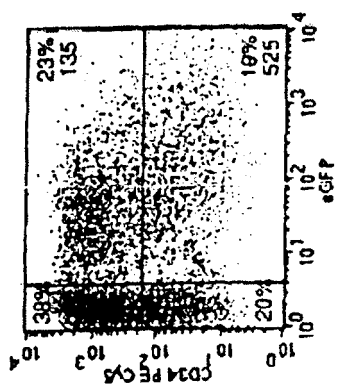


FIG. 98(2)

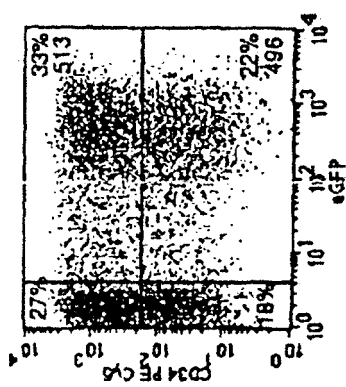


FIG. 98(4)

LTR de VIH-1

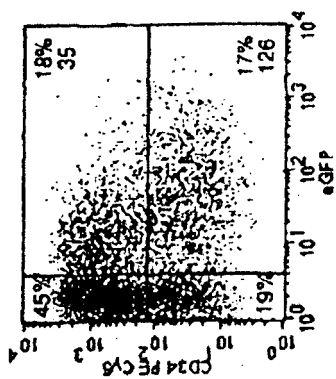


FIG. 98(1)

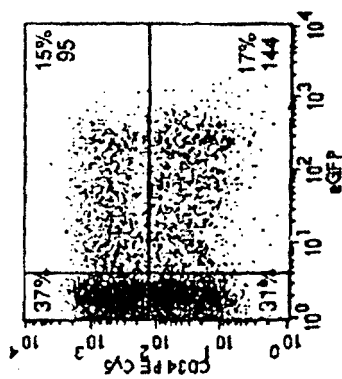


FIG. 98(3)

Promotor de CMV

Promotor EF-1 alfa

ES 2 280 250 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> INSTITUT PASTEUR INSERM
- 5 <120> ADN DE TRIPLE HÉLICE LENTIVIRAL, Y VECTORES Y CÉLULAS RECOMBINANTES QUE CONTIENEN ADN DE TRIPLE HÉLICE LENTIVIRAL
- <130> B4681_01.app
- <140> NO SE HA ASIGNADO TODAVÍA
- 10 <141> 10-10-2000
- <150> 60/158.387
- <151> 12-10-1999
- 15 <160> 24
- <170> PatentIn Ver. 2.1
- <210> 1
- <211> 25
- 20 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 25 <223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR DE MUTAGÉNESIS BASADO EN PLÁSMIDO pLAI3
- <400> 1
- 30 caattttaa agaagagggg ggatt 25
- <210> 2
- <211> 43
- 35 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 40 <223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR DE MUTAGÉNESIS BASADO EN PLÁSMIDO pLAI3
- <400> 2
- 45 attcatccac aactcaagc gccgcggtgg tattgggggg tac 43
- <210> 3
- <211> 23
- 50 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR PARA AMPLIFICAR EL ÁCIDO NUCLEICO QUE CODIFICA PARA LA PROTEÍNA FLUORESCENTE VERDE POTENCIADA
- 55 <400> 3
- 60 ccggatcccc accggtcgcc acc 23
- <210> 4
- <211> 23
- 65 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

ES 2 280 250 T3

	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR PARA AMPLIFICAR NUCLEÓTIDOS QUE CODIFICAN PARA LA PROTEÍNA FLUORESCENTE VERDE POTENCIADA	
5	<400> 4	
	ccctcgagct agagtcgagg ccg	23
10	<210> 5	
	<211> 47	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR PARA AMPLIFICAR pUCLTRRI-	
20	<400> 5	
	cggaattcgg atccgggcc gcatcgatct tgtcttcgtt gggagtg	47
25	<210> 6	
	<211> 40	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR PARA AMPLIFICAR pUCLTRRI-	
35	<400> 6	
	cggaattcag ccgtctcgag agatgctgca tataagcagc	40
40	<210> 7	
	<211> 38	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR PARA AMPLIFICAR cPPT Y CTS DE pLAI3	
	<400> 7	
50	gtggtcggcg ccgaattcac aaatggcagt atccatcc	38
	<210> 8	
55	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR PARA AMPLIFICAR cPPT Y CTS DE pLAI3	
	<400> 8	
65	gtcgtcggcg ccccaaagtg gatctctgct gtcc	34

ES 2 280 250 T3

	<210> 9	
	<211> 38	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR PARA AMPLIFICAR LA SECUENCIA DE TRIPLE HÉ- LICE DEL PROMOTOR EF1 alfa EN LA MATRIZ pLai	
10		
	<400> 9	
	gtcgtcggcg ccgaattcac aaatggcagt attcatcc	38
15		
	<210> 10	
	<211> 39	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR PARA AMPLIFICAR LA SECUENCIA DE TRIPLE HÉ- LICE DEL PROMOTOR EF1 alfa EN LA MATRIZ pLai	
25		
	<400> 10	
	agcctcacga cgcgtatcag ccaaagtgga tctctgctg	39
30		
	<210> 11	
	<211> 26	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR PARA AMPLIFICAR LA SECUENCIA DE TRIPLE HÉ- LICE DEL PROMOTOR EF1 alfa EN LA MATRIZ pEFpgkneo	
40		
	<400> 11	
	ctgatacgcg tcgtgaggct cgggtg	26
45		
	<210> 12	
	<211> 26	
50	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR PARA AMPLIFICAR LA SECUENCIA DE TRIPLE HÉ- LICE DEL PROMOTOR EF1 alfa EN LA MATRIZ pEFpgkneo	
55		
	<400> 12	
	cgggatcctg tgttctggcg gcaaac	26
60		
	<210> 13	
	<211> 23	
65	<212> ADN	
	<213> <i>Homo Sapiens</i>	

ES 2 280 250 T3

	<400> 13	
	ccctcgagct agagtcgctgg ccg	23
5	<210> 14	
	<211> 23	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Homo Sapiens</i>	
	<400> 14	
15	ccggatcccc accggtcgcc acc	23
	<210> 15	
	<211> 21	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR PARA LA AMPLIFICACIÓN DE ADN VIRAL DE pLAI3	
	<400> 15	
30	agaagaaatg atgacagcat g	21
	<210> 16	
	<211> 17	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR PARA LA AMPLIFICACIÓN DE ADN VIRAL DE pLAI3	
	<400> 16	
45	tgccagtct agctctg	17
	<210> 17	
	<211> 20	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
55	<223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR PARA LA SÍNTESIS DE SONDA PARA EL VECTOR pTRIPGFP	
	<400> 17	
60	cagggacttg aaagcgaag	20
	<210> 18	
	<211> 27	
65	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	

ES 2 280 250 T3

<223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR PARA LA SÍNTESIS DE SONDA PARA EL VECTOR pTRIPGFP

5 <400> 18

gcttggtgtaa ttgtaattt cctgtc

27

<210> 19

10

<211> 7

<212> PRT

<213> Virus de inmunodeficiencia humana de tipo 1

15

<220>

<221> PÉPTIDO

<222> (1)..(7)

<223> Secuencia cPPT de VIH-1 parcial.

20

<400> 19

Asn Phe Lys Arg Lys Gly Gly
1 5

25

<210> 20

<211> 19

<212> ADN

30

<213> Virus de inmunodeficiencia humana de tipo 1

<400> 20

35

ttttaaaga aaagggggg

19

<210> 21

<211> 19

40

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

45

<223> Descripción de la secuencia artificial: MUTACIÓN INTRODUCIDA EN LA SECUENCIA DE cPPT de VIH-1

<400> 21

50

ttttaaacgc aaaggtgt

19

<210> 22

55

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

60

<223> Descripción de la secuencia artificial: PÉPTIDO MUTANTE DE LA SECUENCIA DE cPPT del VIH-1

<400> 22

65

Asn Phe Lys Arg Arg Gly Gly
1 5

