



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 221 578**

② Número de solicitud: 200301398

⑤ Int. Cl.

**C12N 15/867** (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

② Fecha de presentación: **13.06.2003**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **16.12.2004**

Fecha de la concesión: **02.02.2006**

⑤ Fecha de anuncio de la concesión: **01.03.2006**

⑤ Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**01.03.2006**

⑦ Titular/es: **Universidad de Jaén  
Paraje "Las Lagunillas", s/n, Edificio B-1  
23071 Jaén, ES**

⑦ Inventor/es: **Luque Vázquez, Francisco y  
Oya Aponte, Ricardo Antonio**

⑦ Agente: **Fernández Marquina, Pilar**

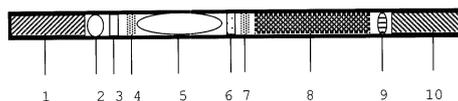
⑤ Título: **Vector diseñado para la destrucción de los virus latentes en el tratamiento de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) mediante terapia génica.**

⑤ Resumen:

Vector diseñado para la destrucción de los virus latentes en el tratamiento de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) mediante terapia génica.

La invención se refiere a un vector génico, dirigido al tratamiento de la infección por VIH-1, que permite destruir las células con virus latentes así como a cualquier célula infectada por VIH-1, respetando las células sanas.

El vector consta de una base retrovítica que permite su introducción en las células diana del VIH-1. Un sistema de activación de virus latentes que consiste en el gen *tat* de HIV-1 con los dos exones fusionales y sujeto a un control de expresión exógena, y un sistema para detectar y eliminar a los virus VIH-1 que consiste en un gen de letalidad celular dentro de un intrón que contiene a la secuencia RRE de VIH-1. El VIH-1 latente es activado por TAT y produce REV, el cual interacciona con el elemento RRE y permite que se exprese el gen de letalidad, que provoca la muerte celular y del virus.



1. LTR 5' (Extremo 5' del provirus de VIH-1)
2. RBS (Lugar de unión al ribosoma de VIH-1)
3. PSI (Secuencia señal de encapsidación de VIH-1)
4. sd (Lugar que señala el inicio de un intrón)
5. Gen que produce letalidad celular
6. RRE (Elemento de respuesta al gen REV de VIH-1)
7. sa (lugar que señala el final de un intrón)
8. Construcción genética con el gen *tat* de VIH-1 inducible exógenamente
9. PPT (tramo con muchas purinas de VIH-1)
10. LTR 3' (Extremo 3' del provirus de VIH-1)

Figura 1

ES 2 221 578 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

## DESCRIPCIÓN

Vector diseñado para la destrucción de los virus latentes en el tratamiento de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) mediante terapia génica.

### Sector de la técnica

La invención se encuadra en el sector farmacéutico, dirigido al tratamiento de la infección por VIH-1, agente que produce el SIDA en los seres humanos.

### Estado de la técnica

El SIDA se ha convertido en los países occidentales en una enfermedad crónica. Actualmente y siempre que el paciente lo tolere bien, se practica una poliquimioterapia basada en un cóctel de fármacos dirigidos a bloquear distintas proteínas del virus. En la mayoría de los pacientes esta terapia da buenos resultados llegando en algunos pacientes a anular casi completamente la multiplicación del virus y previniendo la infección de nuevas células. Esto llevó hace unos pocos años a creer que mediante esta estrategia se podría curar el SIDA. Se pensaba de hecho que en un plazo comprendido entre 2.3 a 3.1 años se podría erradicar por completo el virus de los pacientes infectados por HIV-1 (S. Perelson *et al.*, 1997; Nature 387: 188191). Estudios posteriores, (D. Finzi and R. F. Siliciano, 1998; Cell 93: 665-671, P. van Rij *et al.*, 2002; Antivir. Ther. 7: 37-41, T. W. Chun and A. S. Fauci, 1999; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 10958-10961), han demostrado que esto no es así, y han puesto de manifiesto la existencia de reservorios donde el virus parece estar a salvo de las terapias y del sistema inmune. En este sentido cabe destacar la existencia de virus latentes dentro de distintos tipos de células del sistema inmune como los linfocitos de memoria. Estos reservorios permanecen inalterados después de varios años de terapia, pudiéndose activar estos virus latentes en cualquier momento y producir virus infecciosos. Por lo tanto estos virus latentes constituyen la razón principal por la cual no es posible curar la infección por VIH-1 con las terapias actuales. Existen además células de baja producción de virus como son los macrófagos o células dendríticas que pueden sobrevivir, a pesar de la terapia antirretroviral, mucho tiempo en este estado de producción viral.

El desarrollo de potentes terapias antirretrovirales ha supuesto en principio un argumento en contra de seguir con el desarrollo de terapias génicas para el tratamiento de esta enfermedad, de manera que en los últimos años se ha disminuido el esfuerzo por el desarrollo de tratamientos basados en terapia génica para el tratamiento del SIDA. No obstante, la imposibilidad de erradicar al virus con terapias convencionales hace que se requiera del desarrollo de alternativas terapéuticas como la terapia génica. Fundamentalmente se está atendiendo a la modificación de células madre de linfocitos para que sean resistentes al virus (B. C. Engel and D. B. Kohn, 1999; Front. Biosci. 4: e26-33) y sobre todo mediante el uso de ribozimas (B. Lamothe y S. Joshi, 2000; Front. Biosci. 5: D527-555 y J. J. Rossi, 2000; Adv. Drug Delivery Rev. 44: 71-78), o muy recientemente se está abordando la posibilidad de crear virus atenuados que potencien al sistema inmune o que interfieran con la multiplicación del virus normal (B. C. Engel and D. B. Kohn, 1999; Front. Biosci. 4: e26-33). También se han utilizado intracuerpos para proteger a las células del sistema inmune frente a la infección por HIV-1 (W. A. Marasco

*et al.*, 1999; J. Immunol Methods 231: 223-238 y M. Mhashilkar *et al.*, 1999; Hum. Gene Ther. 10: 1453-1467). A pesar de todo ello, el virus VIH-1 posee una gran plasticidad genética que le permite producir formas resistentes a las distintas estrategias ensayadas y hasta el momento no se ha publicado ningún resultado concluyente en cuanto a protección *in vivo* mediante terapia génica. Por lo tanto, en el momento actual, no parece un gran problema contener la infección por el VIH-1 en los pacientes a corto o medio plazo, pero resulta imposible atacar a los virus latentes. Esto impide que el paciente quede libre de virus y se pueda curar de la enfermedad. No es posible diseñar fármacos convencionales contra estos; virus latentes, ni el uso de ribozimas puede destruirlos, debido a que en el estado de latencia los virus están en forma de ADN y no son sensibles a las ribozimas. Por esto, en la actualidad solo se puede prolongar la poliquimioterapia de forma indefinida, lo cual conlleva considerables efectos secundarios adversos para el paciente.

Por todo esto los solicitantes han diseñado un vector (construcción genética que se puede introducir en las células deseadas) dirigido a realizar una terapia génica destinada a destruir las células infectadas por virus latentes. Hasta el momento, los reservorios virales han sido objeto de atención escasa y muy parcial, así Mukhtar *et al.* (M. Mukhtar *et al.*, 2000; Hum. Gene Ther. 11: 347-359) han iniciado el desarrollo de una terapia génica frente al reservorio viral presente en el sistema nervioso central. La estrategia que han desarrollado los solicitantes no ha sido descrita ni sugerida por ningún grupo de investigadores previamente. En ella al destruir a las células infectadas por virus latentes se destruyen los reservorios víricos que no son susceptibles de ser eliminados por terapia convencional y se obvia el problema de la generación de virus resistentes, puesto que la diana no es el virus sino la célula infectada. Estas células no son funcionales, por lo que no significa ninguna pérdida para el paciente, en cambio su destrucción supone acabar con estos reservorios que permiten al virus sobrevivir a la poliquimioterapia.

Se ha diseñado un vector que se puede introducir en las células susceptibles de infección por VIH-1. Una vez allí es capaz de detectar a aquellas que están infectadas por virus latentes y las destruye, mientras que si la célula está sana la respeta y no le produce ningún efecto. Los solicitantes han construido un prototipo siguiendo el diseño de este vector y comprobado su perfecto funcionamiento *in vitro*, siendo capaz de destruir a todas las células que llevan virus defectivos latentes y no produciendo ninguna mortalidad entre las células que no los llevan; los virus eran defectivos por motivos de bioseguridad.

### Descripción detallada de la invención

La presente invención consiste en el diseño de un vector para terapia génica del SIDA. Este vector tiene como objetivo entrar en las células susceptibles de infección por el virus VIH-1, detectar si hay un virus en el interior, aunque esté latente y si es así destruir la célula. Para ello el vector contiene todas las secuencias del virus VIH-1 necesarias para poderse encapsidar como el VIH-1, entrar en las mismas células que éste e integrarse en los cromosomas al igual que lo hace el VIH-1. Una vez allí el vector puede realizar su actividad antiviral. El vector contiene una construcción génica en la que el gen tat del VIH-1 se encuentra controlado exógenamente. Existen el mercado en la

actualidad numerosos sistemas de control de la expresión génica que se pueden utilizar para conseguir que el gen *tat* solo se exprese si se añade una sustancia inductora de forma exógena. Al añadir el inductor, el gen *tat* se expresa y provoca en su caso, la activación de un virus latente.

Una vez provocada la activación del virus latente, ya es posible detectarlo. Para ello se utiliza la proteína REV, producto del gen *rev* del virus y que resulta esencial para el mismo. La proteína REV es producida por el virus activado y hace que el ARNm del virus recién transcrito sea transportado al citoplasma celular y no se procesen los intrones (se quiten del ARNm). El vector está diseñado de tal manera que lleva en un intrón un gen que produce la muerte de la célula. Ese intrón normalmente es quitado del ARNm y por lo tanto no se va a expresar el gen de muerte celular. La presencia de proteína REV del virus activado provoca que el ARNm de nuestro vector sea transportado al citoplasma sin que se elimine el intrón y entonces se produce la síntesis de la proteína codificada por el gen de letalidad y se produce la muerte celular. Para que esto ocurra, el vector incluye la secuencia RRE, que es reconocida por la proteína REV y permite que ese ARNm sea transportado al citoplasma sin ser quitado el intrón.

Por lo tanto, solamente se expresa el gen de letalidad celular en presencia de proteína REV, y ésta solo se produce en presencia de un virus VIH-1 activado. Esto constituye un mecanismo de seguridad que evita que las células no infectadas por el virus del VIH-1 induzcan la expresión del gen de letalidad celular, y por lo tanto no mueran. Este vector no solo permite destruir a las células con virus latentes sino también a cualquier célula infectada por VIH-1.

Lo original en este vector es la combinación de elementos genéticos procedentes tanto del propio virus VIH-1, como extraños al mismo que permiten la destrucción de células infectadas, incluso por virus latentes y respeta a las células sanas.

#### **Modos de realización de la invención**

Los solicitantes han construido un prototipo de la presente invención cuyos resultados altamente satisfactorios ya se han comentado antes.

Características del prototipo:

1. El gen *tat* está bajo un sistema inducible por IPTG obtenido a partir del Sistema de Expresión Inducible en Mamíferos LacSwitch II de STRATAGENE. Se han tomado los siguientes elementos de ese sistema de expresión con la inclusión entre ellos del gen *tat*: promotor de RSV, dos secuencias operadoras, gen *tat*, poliA, promotor de CMV1 gen lacI NLS.

2. El gen de letalidad utilizado es el gen p53 humano. Éste es un gen celular normal con actividad antioncogénica que expresado a altos niveles produce la apoptosis celular (muerte celular programada, es decir el suicidio de la célula).

El resto de los detalles del prototipo están perfectamente definidos en la figura 1.

El prototipo resulta completamente inocuo para células que carecen de virus defectivos latentes y mata al 100% de las células que llevan a un virus defectivo latente en presencia de concentraciones entre 3 y 7 mM de IPTG.

#### **Descripción de las figuras**

Figura 1

El vector para el tratamiento del SIDA consiste en una base retroviral con los elementos esenciales para su encapsidación (3) retrotranscripción e integración (1) y así permitir su introducción en las células diana del VIH-1. Lleva a continuación al gen de letalidad celular (5) flanqueado por las secuencias que determinan a un intrón (4 y 7) incluyendo a la secuencia RRE (6). De tal manera que el gen de letalidad será quitado del ARNm y por lo tanto no se expresa a menos que en la célula haya un VIH-1 que produzca proteína REV, en cuyo caso esta proteína REV interacciona con el elemento RRE y permite que el intrón sea leído por los ribosomas y se exprese el gen de letalidad. Este es un mecanismo clave de la construcción porque permite una gran bioseguridad para las células que reciban al vector y no estén infectadas por VIH-1.

A continuación se encuentra el gen *tat* de VIH-1 pero no en su forma nativa con dos exones y un intrón, sino con los dos exones fusionados (8). Este gen está sujeto a una fuerte represión salvo que se añada un inductor exógenamente. Esto se puede realizar utilizando varios de los sistemas de expresión génica en mamíferos que existen en el mercado. Un ejemplo de ello se encuentra en el prototipo construido, descrito anteriormente.

Figura 2

*Esquema de la actuación del vector en presencia de un virus latente*

En ausencia de inducción externa el vector es completamente silencioso, mientras que la adición del inductor permite que se exprese *tat*, se produce entonces la proteína TAT y esta activa a un posible virus latente en la célula. Este virus expresa el gen *rev* y se produce la proteína REV, que a su vez produce la expresión del gen de letalidad del vector y la célula muere y con ella el virus. Las inducciones están representadas por flechas.

### REIVINDICACIONES

1. Vector diseñado para la destrucción de los virus latentes en el tratamiento de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) mediante terapia génica, **caracterizado** por consistir en:

- a) Una base retrovítica con los elementos esenciales para la encapsidación (3), retro-transcripción e integración en el genoma celular (1) y así permitir su introducción en las células diana del VIH-1.
- b) Un sistema de activación de virus latentes que consiste en el gen *tat* de HIV-1 con los dos exones fusionados (8). Este gen está sujeto a una fuerte represión salvo que se añada un inductor exógenamente. Esto se puede realizar utilizando varios de los sis-

temas de expresión génica en mamíferos que existen en el mercado.

- c) Un sistema para detectar y eliminar a los virus VIH-1 mediante la inclusión de un gen de letalidad celular (5) flanqueado por las secuencias que determinan a un intrón (4 y 7) (donador y aceptor de splicing) incluyendo también a la secuencia RRE de VIH-1 (6). De tal manera que el gen de letalidad no se expresará a menos que en la célula haya un VIH-1 activado que produzca proteína REV, en cuyo caso REV interaccionará con el elemento RRE y permitirá que se exprese el gen de letalidad. Este es un mecanismo clave de la construcción porque permite una gran bioseguridad para las células que reciban al vector y no estén infectadas por VIH-1.

5

10

15

20

25

30

35

40

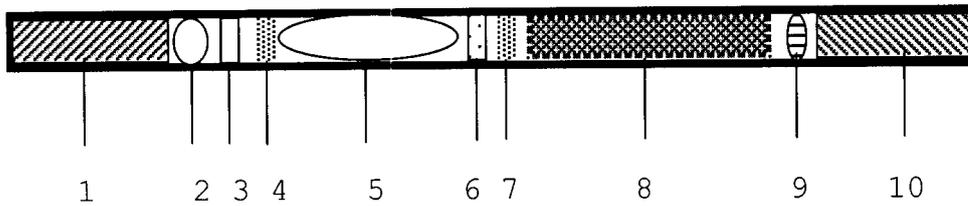
45

50

55

60

65



1. LTR 5' (Extremo 5' del provirus de VIH-1)
2. RBS (Lugar de unión al ribosoma de VIH-1)
3. PSI (Secuencia señal de encapsidación de VIH-1)
4. sd (Lugar que señala el inicio de un intrón)
5. Gen que produce letalidad celular
6. RRE (Elemento de respuesta al gen REV de VIH-1)
7. sa (lugar que señala el final de un intrón)
8. Construcción genética con el gen *tat* de VIH-1 inducible exógenamente
9. PPT (tramo con muchas purinas de VIH-1)
10. LTR 3' (Extremo 3' del provirus de VIH-1)

Figura 1

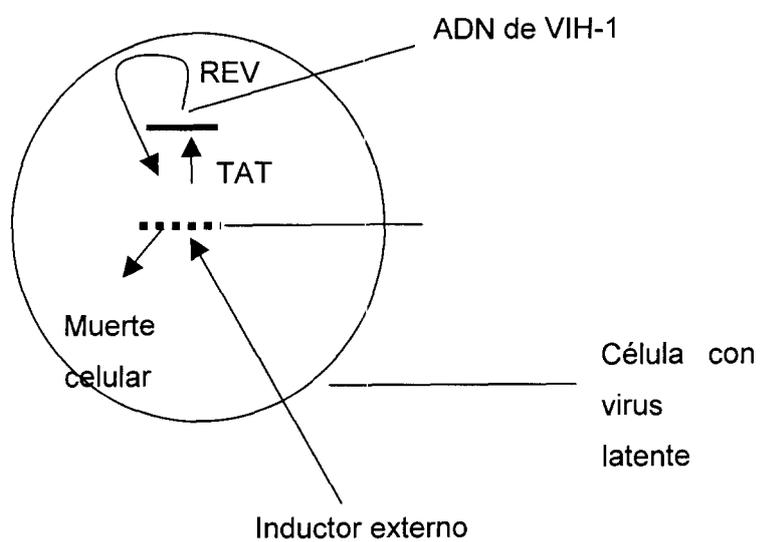


Figura 2



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 221 578

② Nº de solicitud: 200301398

③ Fecha de presentación de la solicitud: 13.06.2003

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.7: C12N 15/867

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	RAGHEB et al. "Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 by Tat/Rev-Regulated Expression of Cytosine Deaminase, Interferon alpha 2, or Diphtheria Toxin Compared with Inhibition by Transdominant Rev". Enero 1999. HUMAN GENE THERAPY, Vol. 10, páginas 103-112.	1
Y	WO 9637623 A (OXFORD BIOMEDICA LIMITED) 28.11.1996, página 4, línea 9 - página 5, línea 2; página 6, línea 6 - página 7, línea 4.	1
Y	CAPUTO A. et al. "The HIV-1 tat gene as a target for gene therapy and analysis of its role in cell proliferation". L'IGIENE MODERNA. 1995, Vol. 104, páginas 273-292.	1
A	MUKHTAR M. et al. "Evaluation of relative promoter strenghts of the HIV-1-LTR and a chimeric RSV-LTR in T lymphocytic cells and peripheral blood mononuclear cells: promoters for anti-HIV-1 gene therapies". GENE THERAPY. 1996, páginas 725-730.	1
A	MUKHTAR M. et al. "Anti Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gene Therapy in Human Central Nervous System-Based Cells: An Initial Approach against a Potential Viral Reservoir". HUMAN GENE THERAPY. 2000, Vol. 11, páginas 347-359.	1

**Categoría de los documentos citados**

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

**Fecha de realización del informe**

19.11.2004

**Examinador**

A. Collados Martín Posadillo

**Página**

1/1