

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 812 202**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/867** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.12.2016 PCT/EP2016/081964**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.06.2017 WO17108817**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2016 E 16819072 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.05.2020 EP 3394271**

54 Título: **Integración estable de los vectores de transferencia lentivirales SIN**

30 Prioridad:

**21.12.2015 EP 15201510**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**16.03.2021**

73 Titular/es:

**MOLMED SPA (100.0%)  
Via Olgettina 58  
20132 Milan, IT**

72 Inventor/es:

**STORNAIUOLO, ANNA;  
BOVOLenta, CHIARA;  
MAVILIO, FULVIO y  
RIZZARDI, GIAN PAOLO**

74 Agente/Representante:

**SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio**

ES 2 812 202 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**

Integración estable de los vectores de transferencia lentivirales SIN

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la producción de vectores lentivirales (LV) para terapia génica. Con mayor particularidad, la invención se refiere a un sistema para obtener la integración estable de un vector de transferencia lentiviral autoinactivable (SIN) en una línea celular de empaquetamiento. El vector de transferencia lentiviral SIN se integra mediante el uso de un fragmento de ADN que contiene las repeticiones terminales invertidas (ITR) del virus adenoasociado (AAV), obteniendo así la línea celular productora estable para vectores lentivirales SIN.

Antecedentes

15 Más de una década de investigación y desarrollo ha enriquecido drásticamente la eficacia y la seguridad de la tecnología del vector lentiviral (LV) basada en VIH en la terapia génica. La implementación de células de empaquetamiento del LV estables en la clínica representa un hito obligatorio para reducir el costo de fabricación y mejorar la calidad y seguridad general de los vectores. Hasta ahora, varias estrategias han generado células de empaquetamiento del LV estables que difieren, esencialmente, por la transferencia de los genes de empaquetamiento, es decir, plásmidos frente a vectores de integración, y una naturaleza diferente de la envoltura de pseudotipado. Una vez obtenida una línea celular de empaquetamiento estable que incluye proteínas estructurales y reguladoras lentivirales, así como la proteína de envoltura preferida, es necesario integrar el vector de transferencia, que incorpora el gen de interés, en el genoma de la línea celular. La línea celular estable resultante se llama línea celular productora. La línea celular productora es la herramienta estable definitiva para la producción de vectores lentivirales que incluyen el gen de interés.

Aunque existen varios sistemas recombinantes que, en principio, permiten la integración estable de genes extraños en el genoma de las células diana, en el caso de genes o sistemas de expresión complejos, es necesario construir un vehículo de transferencia de genes apropiado que permita la integración, así como la funcionalidad del casete de expresión final. Esto es particularmente importante con respecto al desarrollo de líneas celulares productoras para vectores lentivirales autoinactivables (SIN). En este tipo de vectores, la delección de las secuencias potenciadoras y promotoras lentivirales de la LTR 3' resulta en la generación de vectores que, al infectar las células diana, son incapaces de transcribir ARN de la longitud del vector. Debido a esta modificación, los vectores SIN integrados son incapaces de una replicación adicional, reduciendo así la probabilidad de generar virus competentes para la replicación, así como el peligro de influir inadvertidamente en la actividad de transcripción de promotores endógenos cercanos. Debido a su estructura, la introducción de vectores de transferencia SIN en las líneas celulares de empaquetamiento no se puede lograr con el método tradicional de transducción viral que, en virtud de la delección de inactivación, resulta ser incompatible con la integración de un vector de transferencia funcional.

40 Para superar este problema, Xu y otros, 2001 desarrollaron un vector de transferencia SIN condicional, en el que reemplazaron los elementos reguladores de la transcripción U3 de la LTR 3' con un promotor inducible (elemento sensible a Tet). Este tipo de sistemas puede resolver el problema, pero son un compromiso en el diseño del vector, ya que la LTR puede mantener un nivel de expresión basal.

45 Una de las formas posibles de obtener una integración estable de un vector de transferencia completamente SIN mediante un método no retroviral es la cotransfección de un plásmido vector y un plásmido con resistencia a fármacos seleccionable (Ikeda y otros, 2003). Este sistema resulta ser ineficiente tanto para la integración como para la estabilidad de las integraciones. Throm y otros, 2009 describen una línea celular productora en la que un vector de transferencia completamente SIN se integra establemente en el genoma mediante la transfección de una matriz de concatémeros. Dicha matriz se obtiene mediante la unión de fragmentos de ADN que codifican el genoma del vector de transferencia SIN, con casetes de resistencia a fármacos incluidos en la matriz. A pesar de que el método descrito resulta ser efectivo para el desarrollo de una línea celular productora, el sistema incluye el paso adicional de formación de la matriz, agregando así un nivel adicional de complejidad a la tecnología.

55 El estado de la técnica también incluye a Di Nunzio y otros, HUMAN GENE THERAPY, vol. 18, no. 9, 1 2007, 811-820, que describe el pseudotipado de vectores lentivirales con la glicoproteína RD114-TR (y se aplica a un vector de transferencia SIN-GFP).

60 Existe la necesidad de desarrollar métodos más simples para integrar el genoma del vector de transferencia SIN completo en una línea celular de empaquetamiento estable, con el objetivo de obtener una línea celular productora efectiva. La presente invención aborda esta necesidad.

Resumen de la invención

65 La presente invención se refiere al campo de producción de vectores lentivirales autoinactivables (SIN LV). Varios ensayos clínicos de terapia génica están en curso con el empleo de SIN-LV como vehículos de transferencia de genes.

Por razones de seguridad, este tipo de vectores deben considerarse como vectores de elección en ensayos clínicos. En la gran mayoría de los ensayos clínicos, la producción de SIN LV continúa basándose en protocolos transitorios. Una de las cuestiones clave a resolver para el desarrollo de una línea celular productora estable para SIN LV es el desarrollo de un sistema simple que permita la integración estable de vectores de transferencia SIN.

5 La presente invención proporciona una nueva estrategia para integrar el vector de transferencia lentiviral SIN en el genoma de las líneas celulares de empaquetamiento, que ya contienen la proteína lentiviral estructural (gag/pol), la proteína reguladora rev y la proteína de envoltura de elección.

10 Dicha estrategia se basa en la transfección de fragmentos de ADN que comprenden las repeticiones terminales invertidas (ITR) del virus adenoasociado (AAV) en los extremos 5' y 3' que flanquean una construcción compleja que contiene al menos un vector de transferencia SIN y un gen de resistencia a antibióticos, que se coloca aguas abajo de la LTR 3' lentiviral y se expresa mediante un promotor independiente.

15 Mediante la simple transfección de los fragmentos de ADN anteriores en una línea celular de empaquetamiento que incluye componentes lentivirales estructurales (gag/pol) y reguladores (rev) y la proteína de envoltura, fue posible obtener una línea celular productora estable para SIN LV.

#### Declaraciones de la invención

20 De acuerdo con un primer aspecto de la invención se proporciona un sistema para la integración estable de un vector de transferencia lentiviral SIN en una línea celular de empaquetamiento, en donde dicho sistema consiste en un fragmento de ADN que comprende los siguientes elementos, a partir del extremo 5':

- 25
- i. La repetición terminal invertida del virus adenoasociado (AAV ITR)
  - ii. Un vector de transferencia lentiviral SIN
  - iii. Un promotor constitutivo que regula la expresión de un gen de resistencia a antibióticos
  - iv. Un gen de resistencia a antibióticos
  - v. La repetición terminal invertida del virus adenoasociado (AAV ITR)
- 30

En una modalidad el vector de transferencia lentiviral SIN comprende en la posición 5' toda la repetición terminal larga (LTR) lentiviral y, en la posición 3', una delección de las secuencias potenciadoras y promotoras de la LTR lentiviral.

35 En otra modalidad el vector de transferencia lentiviral SIN comprende en la posición 5' una LTR lentiviral en la que el segmento U3 ha sido sustituido por un promotor y, en la posición 3', una delección de las secuencias potenciadoras y promotoras de la LTR lentiviral. El promotor sustituido se selecciona de CMV, CMV IE, PGK, SV40, eF1 $\alpha$  SFFV y RSV con mayor preferencia el promotor es un promotor CMV IE.

40 El gen de resistencia a antibióticos empleado en el sistema se selecciona del gen de resistencia a higromicina, kanamicina, neomicina, bleomicina, fleomicina o Zeocin®, preferentemente el gen de resistencia a Zeocin®. Un promotor seleccionado de CMV, CMV IE, PGK, SV40, eF1 $\alpha$ , SFFV y RSV, regula la expresión del gen de resistencia, preferentemente el promotor es un promotor SV40.

45 En otro aspecto de la presente invención se proporciona un método para obtener una línea celular productora para vectores lentivirales SIN que comprende:

- 1) Preparar un fragmento de ADN que comprende, a partir del extremo 5':

- 50
- i. La repetición terminal invertida del virus adenoasociado (AAV ITR)
  - ii. Un vector de transferencia lentiviral SIN
  - iii. Un promotor constitutivo que regula la expresión de un gen de resistencia a antibióticos
  - iv. Un gen de resistencia a antibióticos
  - v. La repetición terminal invertida del virus adenoasociado (AAV ITR)

- 55
- 2) Transfectar una línea celular de empaquetamiento para vectores lentivirales con dicho fragmento de ADN
  - 3) Seleccionar la línea celular productora mediante el cultivo de las células en presencia del antibiótico

60 En una modalidad el vector de transferencia lentiviral SIN comprende en la posición 5' toda la repetición terminal larga (LTR) lentiviral y, en la posición 3', una delección de las secuencias potenciadoras y promotoras de la LTR lentiviral.

En otra modalidad el vector de transferencia lentiviral SIN comprende en la posición 5' una LTR lentiviral en la que el segmento U3 ha sido sustituido por un promotor y, en la posición 3', una delección de las secuencias potenciadoras y promotoras de la LTR lentiviral. El promotor sustituido se selecciona de CMV, CMV IE, PGK, SV40, eF1 $\alpha$  SFFV y RSV, con mayor preferencia el promotor es un promotor CMV IE.

65

El gen de resistencia a antibióticos empleado en el sistema se selecciona del gen de resistencia a higromicina, kanamicina, neomicina, bleomicina, fleomicina o Zeocin®, preferentemente el gen de resistencia a Zeocin®. Un promotor seleccionado de CMV, CMV IE, PGK, SV40, eF1α, SFFV y RSV, regula la expresión del gen de resistencia, preferentemente el promotor es un promotor SV40.

5 Preferentemente, la línea celular de empaquetamiento es una línea celular de empaquetamiento estable obtenida de una línea celular hospedera que contiene en su genoma gag/pol lentiviral, rev lentiviral y una proteína de envoltura. En una modalidad adicional la línea celular de empaquetamiento adicional contiene tat lentiviral integrado establemente en el genoma de la célula.

10 La línea celular hospedera es una línea celular humana seleccionada preferentemente de HEK293, HEK293-T, HEK293-SF, TE671, HT1080 o HeLa, con mayor preferencia la línea celular es HEK293-T.

15 El gen env se selecciona de VSV-G env, MLV 4070 env, RD114 env, proteína de envoltura química RD114-TR, proteína de envoltura química RD114pro, GP64 env de baculovirus o GALV env o derivados de los mismos, con mayor preferencia el gen env es el gen que codifica la RD114-TR.

20 En un aspecto adicional de la invención, se proporciona la línea celular productora para vectores lentivirales SIN que se puede obtener mediante el método anterior.

En un aspecto adicional de la invención, se proporciona una línea celular productora que contiene en su genoma al menos una copia de un fragmento de ADN que comprende, a partir del extremo 5':

- 25
- i. La repetición terminal invertida del virus adenoasociado (AAV ITR)
  - ii. Un vector de transferencia lentiviral SIN
  - iii. Un promotor constitutivo que regula la expresión de un gen de resistencia a antibióticos
  - iv. Un gen de resistencia a antibióticos
  - v. La repetición terminal invertida del virus adenoasociado (AAV ITR)

30 En otro aspecto de la invención, se proporciona un método para producir vectores lentivirales SIN que comprende cultivar una línea celular productora que contiene en su genoma al menos una copia de un fragmento de ADN que comprende a partir del extremo 5':

- 35
- i. La repetición terminal invertida del virus adenoasociado (AAV ITR)
  - ii. Un vector de transferencia lentiviral SIN
  - iii. Un promotor constitutivo que regula la expresión de un gen de resistencia a antibióticos
  - iv. Un gen de resistencia a antibióticos
  - v. La repetición terminal invertida del virus adenoasociado (AAV ITR)

40 Descripción detallada de la invención

Se describirá una descripción detallada de las características y modalidades preferidas de la invención mediante un ejemplo no limitante.

45 La invención puede ponerse en práctica por una persona de habilidad común en la técnica, que empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de química, biología molecular, microbiología, ADN recombinante e inmunología. Dichas técnicas se describen y explican en la literatura científica publicada. Véase, por ejemplo, J. Sambrook, E. F. Fritsch, y T. Maniatis, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición, libros 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F.M. y otros (1995 y suplementos periódicos; Current Protocols in Molecular Biology, cap. 9, 13 y 16, John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y.); Current Protocols in Immunology, cap. 12, John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y.); B. Roe, J. Crabtree y A. Kahn, 1996, DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques, John Wiley & Sons; J. M. Polak y James O'D. McGee, 1990, In Situ Hybridization: Principles and Practice; Oxford University Press; M. J. Gait (Editor), 1984, Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, Irl Press; y, D. M. J. Lilley y J.E. Dahlberg, 1992, Methods of Enzymology: DNA Structure Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology, Academic Press.

Sistema para la integración del vector de transferencia SIN

60 La presente invención proporciona una nueva estrategia para obtener una línea celular productora estable necesaria para la producción de vectores lentivirales autoinactivables (SIN). Como se usa en la presente, el término línea celular productora estable significa una línea celular de empaquetamiento para vectores lentivirales en la que al menos una copia del vector de transferencia lentiviral se ha introducido, y se ha integrado establemente en su genoma.

65 Como se usa en la presente el término línea celular de empaquetamiento significa una línea celular hospedera que contiene en su genoma la proteína estructural gag/pol lentiviral, la proteína reguladora rev lentiviral y la proteína de envoltura de interés. Preferentemente la proteína de envoltura se selecciona del grupo que consiste en VSV-G env,

MLV 4070 env, RD114 env, proteína de envoltura quimérica RD114-TR, proteína de envoltura quimérica RD114pro, GP64 env de baculovirus o GALV env. Opcionalmente la línea celular de empaquetamiento puede contener además la proteína lentiviral tat integrada establemente en su genoma.

5 El término "vector de transferencia lentiviral" significa una construcción que contiene el gen de interés flanqueado al menos por las secuencias lentivirales necesarias para el empaquetamiento en los viriones (es decir, señales psi) y para la integración en el genoma de la célula transducida (es decir: repeticiones terminales largas, LTR 5' y 3'). Con mayor particularidad, la construcción del vector de transferencia lentiviral es un fragmento de ADN que incluye al menos los siguientes componentes a partir del extremo 5': la LTR 5' lentiviral, el sitio donante de empalme (SD), la  
10 secuencia de empaquetamiento ( $\psi$ ,  $\Psi$ ), la secuencia de gag truncada y el elemento de respuesta a rev (RRE) lentiviral, el sitio aceptor de empalme (SA), un gen de interés cuya expresión está regulada por un promotor independiente y la LTR 3' lentiviral. Opcionalmente se pueden incluir elementos adicionales en el vector de transferencia tales como un WPRE o el tracto central de polipurina (cPPT). Opcionalmente, la LTR 5' del vector de  
15 transferencia puede modificarse de tal manera que la región U3 de la LTR 5' puede sustituirse por un promotor constitutivo seleccionado de CMV, CMV IE, PGK, SV40, eF1 $\alpha$  SFFV y RSV con el fin de obtener un vector lentiviral de tercera generación.

Los sistemas desarrollados de acuerdo con la presente invención están dirigidos a la producción estable de los denominados vectores lentivirales SIN, caracterizados porque contienen una LTR 3' con una delección de las  
20 secuencias potenciadoras y promotoras lentivirales. En una modalidad particular, el vector lentiviral SIN contiene una delección de 400 nucleótidos en el LTR 3' como se describe en Zuffrey y otros, 1998. La autoinactivación se basa en la presencia de esta delección que, durante la transcripción inversa, se transfiere a la LTR 5' del ADN proviral, lo que hace que el genoma viral integrado en la célula transducida no sea capaz de transcribirse adicionalmente.

25 La producción de un vector lentiviral SIN requiere el uso de un vector de transferencia que contiene una delección de secuencias potenciadoras y promotoras lentivirales en la LTR 3'. Debido a esta estructura, la introducción de vectores de transferencia SIN en las líneas celulares de empaquetamiento no se puede lograr con el método tradicional de transducción viral que, en virtud de la delección de inactivación, resulta ser incompatible con la integración de un vector de transferencia funcional.  
30

La presente invención proporciona un nuevo sistema para la integración eficiente de un vector de transferencia SIN en el genoma de una línea celular de empaquetamiento con el objetivo de obtener una línea celular productora estable. El sistema consiste en un fragmento de ADN que comprende, a partir del extremo 5':

- 35 i. La repetición terminal invertida del virus adenoasociado (AAV ITR)
- ii. Un vector de transferencia lentiviral SIN
- iii. Un promotor constitutivo que regula la expresión de un gen de resistencia a antibióticos
- iv. Un gen de resistencia a antibióticos
- 40 v. La repetición terminal invertida del virus adenoasociado (AAV ITR)

El fragmento de ADN puede ser lineal o circular.

El fragmento de ADN puede resultar de la linealización de un plásmido que contiene los componentes mencionados anteriormente. Alternativamente, el fragmento de ADN puede contener solo las secuencias entre las dos AAV-ITR.  
45

La presencia de las AAV ITR permite la integración estable en el genoma de la línea celular de empaquetamiento. El gen de resistencia a antibióticos se coloca fuera de la LTR lentiviral, particularmente aguas abajo de la LTR 3' lentiviral. Gracias a esta configuración, es posible seleccionar los clones celulares en los que el gen extraño está integrado establemente, sin incorporar el gen de resistencia a antibióticos en el vector viral final.  
50

En una modalidad adicional se proporciona un método para obtener una línea celular productora estable para el vector lentiviral SIN que comprende:

- 55 1) Preparar fragmentos de ADN que comprenden a partir del extremo 5', al menos los siguientes componentes:

- i. La repetición terminal invertida del virus adenoasociado (AAV ITR)
- ii. Un vector de transferencia lentiviral SIN
- iii. Un promotor constitutivo que regula la expresión de un gen de resistencia a antibióticos
- iv. Un gen de resistencia a antibióticos
- 60 v. La repetición terminal invertida del virus adenoasociado (AAV ITR)

- 2) Transfectar una línea celular de empaquetamiento para el vector lentiviral con dicho fragmento de ADN
- 3) Seleccionar la línea celular productora mediante el cultivo de las células en presencia del antibiótico

65 Se han descrito varios tipos de líneas celulares de empaquetamiento en la técnica, que difieren entre sí solo por el sistema de integración de la gag/pol estructural lentiviral, la proteína reguladora rev, así como la proteína de envoltura.

Por ejemplo, el documento WO 04/22761 describe una línea celular de empaquetamiento en la que la proteína estructural lentiviral se integra en la célula hospedera mediante transducción con vectores retrovirales gamma, mientras Throm y otros, 2009 emplean vectores retrovirales gamma SIN. En el documento WO 2012/028681 la integración de gag/pol y rev se obtiene mediante el uso de una construcción compleja con dos casetes de expresión independientes incorporados en un vector híbrido baculo-AAV, en el documento WO2013121194 la gag/pol lentiviral se integra mediante recombinación específica del sitio. Todos estos ejemplos de línea celular de empaquetamiento estable se pueden usar para obtener una línea celular productora estable mediante la transfección de los fragmentos de ADN de acuerdo con la presente invención que contienen un vector de transferencia lentiviral SIN seguido de un casete de expresión con un gen de resistencia a antibióticos, dicho fragmento flanqueado por AAV ITR.

En una modalidad adicional se proporciona una línea celular productora para el vector lentiviral SIN que contiene en su genoma al menos una copia de un fragmento de ADN que comprende, a partir del extremo 5', al menos los siguientes componentes:

- i. La repetición terminal invertida del virus adenoasociado (AAV ITR)
- ii. Un vector de transferencia lentiviral SIN
- iii. Un promotor constitutivo que regula la expresión de un gen de resistencia a antibióticos
- iv. Un gen de resistencia a antibióticos
- v. La repetición terminal invertida del virus adenoasociado (AAV ITR)

Descripción de las figuras

**Figura 1. (a) Esquema del TV SIN-GFP.** Abreviaturas: AAV-ITR, repetición terminal invertida del virus adenoasociado; CMV, promotor del citomegalovirus; ΔU3, U3 eliminado, RRE, elemento de respuesta a rev; SD, donante de empalme; SA, aceptor de empalme; Ψ, señal de empaquetamiento; WPRE, elemento regulador postranscripcional de la hepatitis de la marmota; cPPT, tracto central de polipurina; SV40-P, promotor del virus del simio 40; zeoR, gen de resistencia a zeocina. **(b, c) Esquemas de los LV SIN-RD114-TR.** Abreviaturas: CMV, promotor del citomegalovirus; ΔU3, U3 eliminado; IN, intrón; BGI, intrón de beta-globina de conejo, RRE, elemento de respuesta a rev; A, secuencia poli-A; IRES, sitio interno de entrada al ribosoma; SD, donante de empalme; SA, aceptor de empalme; Ψ, señal de empaquetamiento; WPRE, elemento regulador postranscripcional de la hepatitis de la marmota; cPPT, tracto central de polipurina.

**Figura 2.** Análisis de las proteínas del vector en las células productoras y en los LV correspondientes. Análisis por transferencia Western de extractos celulares (35 mg/muestra) obtenidos de las células productoras RD3-MolPack24 **(a)** y RD2-MolPack64 **(b)** y de los sobrenadantes correspondientes que contienen partículas virales (100 ng de p24Gag/muestra). Las membranas se hibridaron secuencialmente con un suero humano anti-VIH y los Ac específicos anti-Rev, anti-Tat y anti-RD114-TR indicados y, después de lavar, con el Ac anti-actina. El asterisco (\*) indica una banda no específica.

**Figura 3.** Eficiencia de transducción de linfocitos T activados de sangre periférica ya sea con LV SIN-GFP-zeo de RD3-MolPack24 o pseudotipados con VSV-G. **(a)** Las PBMC totales se preactivaron con Dynabeads de CD3/CD28 durante 48 horas y se cultivaron en presencia de IL-7 e IL-15. Los linfocitos T se transdujeron luego con los LV de RD3-MolPack24 a la MOI indicada y seis y 14 días después de la transducción, se evaluó la expresión de GFP mediante análisis FACS para calcular la eficiencia de la transducción. **(b)** Cuantificación del VCN de SIN-GFP-zeo en linfocitos T del panel a) mediante Q-PCR mediante el uso de conjuntos de sonda-cebador específicos que reconocen la señal de empaquetamiento (Ψ) del vector integrado y el gen de la telomerasa genómica como control. **(c)** Las PBMC se preactivaron como en (a) y luego se transdujeron con 36 ng de p24Gag equivalentes ya sea a LV de RD3-MolPack24 o LV pseudotipados con VSV-G que portaban el TV SIN-GFP-zeo. Seis y 14 días después de la transducción, se evaluó la expresión de GFP mediante análisis FACS. **(d)** Cuantificación del VCN de SIN-GFP-zeo en linfocitos T del panel c) como se describe en (b). Los resultados son el promedio ± SEM de n=3 experimentos independientes. \* p ≤ 0,05; \*\* p ≤ 0,01.

**Figura 4.** Eficiencia de transducción de subconjuntos de linfocitos T activados de sangre periférica ya sea con LV SIN-GFP-zeo de RD3-MolPack24 o pseudotipados con VSV-G. **(a)** Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) totales se pre-activaron con CD3/CD28 Dynabeads durante 48 horas y se cultivaron en presencia de IL-7 e IL-15. Los linfocitos T se transdujeron luego con 36 ng de p24Gag equivalentes a LV de RD3-MolPack24 y seis días después de la transducción, se evaluó la expresión de GFP en subconjuntos de células T CD3+/CD8+ y CD3+/CD8- **(a)**, y en subpoblaciones de células T de memoria de subconjuntos de células T CD3+/CD8+ y CD3+/CD8- **(c)** y **(d)** mediante análisis FACS. **(b)** Frecuencia relativa de subconjuntos de células T CD3+/CD8+ y CD3+/CD8- en células LV- y con transducción simulada. **(e y f)** Frecuencia relativa de células T de memoria central (TCM), células madre T de memoria (TSCM), T de memoria efectoras (TEM) y T de memoria efectoras RA+ (TEMRA) ya sea en los subconjuntos de células T CD3+/CD8+ **(e)** o CD3+/CD8- **(f)** de células LV- y con transducción simulada. Los resultados son la media ± SEM de n=4 experimentos independientes (día 6 p.t.). \* p ≤ 0,05; \*\* p ≤ 0,01.

**Figura 5.** Eficiencia de la transducción de linfocitos T activados de PB ya sea con LV SIN-GFP-zeo de RD3-MolPack24 o pseudotipados con VSV-G a MOI 25. **(a)** Las PBMC totales se preactivaron con CD3/CD28 Dynabeads durante 48

horas y se cultivaron en presencia de IL-7 e IL-15. Los linfocitos T se transdujeron luego con los LV de RD3-MolPack24 o LV pseudotipados con VSV-G que portaban el TV SIN-GFP-zeo a MOI 25 y seis y 14 días después de la transducción, se evaluó la expresión de GFP mediante análisis FACS para calcular la eficiencia de la transducción. (b) Cuantificación del VCN de SIN-GFP-zeo en linfocitos T del panel a) mediante Q-PCR mediante el uso de conjuntos de sonda-cebador específicos que reconocen la señal de empaquetamiento ( $\Psi$ ) del vector integrado y el gen de la telomerasa genómica como control. Los resultados son el promedio  $\pm$  SEM de n=3 experimentos independientes.

**Figura 6.** Eficiencia de la transducción de subconjuntos de linfocitos T activados de PB ya sea con LV SIN-GFP-zeo de RD3-MolPack24 o pseudotipados con VSV-G a MOI 25. (a) Las PBMC totales se preactivaron con CD3/CD28 Dynabeads durante 48 horas y se cultivaron en presencia de IL-7 e IL-15. Los linfocitos T se transdujeron luego con los LV de RD3-MolPack24 a MOI 25 y seis días después de la transducción, se evaluó la expresión de GFP en subconjuntos de células T CD3+/CD8+ y CD3+/CD8- (a), y en subpoblaciones de células T de memoria de subconjuntos de células T CD3+/CD8+ y CD3+/CD8- (c) y (d) mediante análisis FACS. (b) Frecuencia relativa de los subconjuntos de células T CD3+/CD8+ y CD3+/CD8- en células LV- y con transducción simulada. (e y f) Frecuencia relativa de células T de memoria central (TCM), células madre T de memoria (TSCM), T de memoria efectoras (TEM) y T de memoria efectoras RA+ (TEMRA) ya sea en los subconjuntos de células T CD3+/CD8+ (e) o CD3+/CD8- (f) de células LV- y con transducción simulada. Los resultados son el promedio  $\pm$  SEM de n=3 experimentos independientes.

**Figura 7.** Cuantificación de la producción de LV y el metabolismo celular de las células RD3-MolPack24 y RD2-MolPack64. (a) Análisis de la producción de LV normalizada por número de células y (b) por volumen después de 4 y 7 días de cultivo en matraces T25 estándar. (c) Número de células y (d) viabilidad en los puntos de tiempo indicados. (e) Consumo de dextrosa y producción de lactato en los puntos de tiempo indicados. (f) Células viables en suspensión en los puntos de tiempo indicados. \*\* p $\leq$ 0,01.

## Ejemplos

Ejemplo I: Obtención de varias células productoras RD3-MolPack-SIN-GFP

La línea celular productora RD3-MolPack-SIN-GFP se obtuvo a partir de la línea celular de empaquetamiento RD-MolPack descrita en el documento WO2012028681. Brevemente, la línea celular de empaquetamiento RD-MolPack se obtuvo mediante la incorporación en serie de todos los genes del vector a células HEK-293T marcadas: primero los genes de VIH-1 gag, pol, rev y resistencia a higromicina por un vector quimérico baculo-AAV, obteniendo así el denominado clon PK-7. El gen rd114-tr se introdujo posteriormente en las células PK-7 mediante la transferencia de SIN-LV. Particularmente, con el objetivo de obtener una transducción eficiente del gen rd114tr, las células PK-7 se transdujeron con LV pseudotipados con VSV-G derivados transitoriamente que contienen los vectores de transferencia SIN-RD114-TR-IN y SIN-RD114-TR-IN-RRE (Figuras 1b y c), para generar diferentes células de empaquetamiento RD3-MolPack. Después de la selección de puromicina durante un par de semanas y de la medición del número de copias del vector (VCN) de SIN-RD114-TR en varias colonias, las células PK-7-RD314 y PK-7-RD28, que contienen 6 copias de SIN-RD114-TR-IN y 12 copias del SIN-RD114-TR-IN-RRE, respectivamente, se eligieron como dos células de empaquetamiento RD3-MolPack independientes (Tabla 1).

Tabla 1: Número de copias del vector<sup>a</sup> de genes integrados en células RD-MolPack productoras y de empaquetamiento

RD-MolPack de empaquetamiento	Gag/Pol/Rev	Tat	RD114-TR	RD-MolPack productora	SIN-GFP-zeo
PK-7-RD314 (RD114-TR-IN)	2	n.a.	6,00	RD3-MolPack1	15,7
PK-7-RD28 (RD114-TR-IN-RRE)	2	n.a.	12,0	RD3-MolPack24	48,0
PK-7-RD28 (RD114-TR-IN-RRE)	2	n.a.	12,0	RD3-MolPack28	119,0
PK-7-Tat7-RD19 (RD114-TR-IN-RRE)	2	6	13,0	RD2-MolPack64	2,70

<sup>a</sup>El número de copias del vector (VCN) se calculó mediante Q-PCR al menos en tres experimentos independientes mediante el uso de conjuntos de cebadores y sondas específicos, como se informa en el material complementario. n.a., no aplicable.

El paso final para obtener un prototipo de células productoras RD3-MolPack de 3ra generación para SIN-LV, consistió en introducir el SIN-TV ya sea en las células de empaquetamiento PK-7-RD314 o PK-7-RD28. A diferencia de las productoras de 2da generación, en las que el LTR-TV se integra mediante transducción, en las células de 3ra generación, este método no puede aplicarse porque al hacerlo, el TV se autoinactiva en la LTR 5'. Por lo tanto, el SIN-TV debe integrarse mediante una transfección estable. El vector de transferencia (TV) SIN-GFP-zeo se describe en la Figura 1a. El vector de transferencia incluye un casete SIN GFP que contiene un promotor de CMV seguido de una  $\Delta$ U3 en la LTR 5' lentiviral, el fragmento entre el sitio donante de empalme y el SA que incluyen la señal de

empaquetamiento  $\Psi$  y el RRE lentiviral (Dull y otros, 1998); el tracto central de polipurina (cPPT) (Follenzi y otros, 2000); y el elemento regulador post-transcripcional de la hepatitis de la marmota (WPRE) una LTR 3' lentiviral autoinactivable, que contiene una delección de 400 nucleótidos en la LTR 3' (Zuffrey y otros, 1998). Esta construcción se clonó en el plásmido pBSAAVzeo, generando una construcción intermedia SIN-GFP-zeo en la que el TV está  
5 flanqueado además por dos repeticiones terminales invertidas (ITR) del virus adenoasociado (AAV) (Palombo y otros, 1998) y contiene un casete de expresión de SV40P-zeocina aguas abajo de la 3' $\Delta$ U3-LTR (Figura 1a). Después del corte de PstI, el casete SIN-GFP-zeo se clonó en el sitio SmaI de la construcción pGEM3.1Mlul generando así el plásmido TV SIN-GFP-zeo. El plásmido TV SIN-GFP-zeo se linealizó luego mediante PstI para generar el fragmento  
10 de ADN SIN-GFP-zeo que se transfectó en tres células de empaquetamiento RD-MolPack independientes: las células PK-7-RD314 y PK-7-RD28 de 3ra generación descritas anteriormente y las PK-7-Tat7-RD19 (es decir, RD2-MolPack) de 2da generación descritas anteriormente en el documento WO2012028681. La transfección se realizó mediante el uso del kit de Promega: ProFection® Mammalian Transfection System-Calcium Phosphate #E1200. También se probó la RD2-MolPack para verificar si Tat pudiese mejorar de alguna manera el rendimiento de los SIN-LV. Después de la  
15 selección con zeocina y el cribado de varias colonias mediante título físico y funcional para cada tipo de célula (Tabla 2), se escogieron cuatro células productoras independientes: 1) la RD3-MolPack1, derivada de las células PK-7-RD314 que portaban el SIN-RD114-TR-IN y que contiene 16 copias de SIN-GFP-zeo; 2-3) la RD3-MolPack24 y la RD3-MolPack28, ambas derivadas de las células PK-7-RD28, que portaban el SINRD114-TR-IN-RRE y que contienen 48 y 119 copias del TV, respectivamente; y 4) la RD2-MolPack64, derivada de las células PK-7-Tat7-RD19, que portaban el SIN-RD114-TR-IN-RRE y que contiene 2,7 copias del TV (Tabla 1).

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Tabla 2: Caracterización de células productoras Rd-MolPack-SIN-GFP

RD3-MolPack de empaquetamiento	No.	Células productoras RD3-MolPack	Viabilidad (%a)	Título (TU/ml)	Título (TU/célula/día)	p24Gag (ng/ml)	Infectividad (TU/ng)
PK-7-RD314	60b/47c	RD3-MolPack1d	93	$2,8 \times 10^4 \pm 9,2 \times 10^3$	$0,0056 \pm 0,002$	$13,0 \pm 6,20$	$3,8 \times 10^3 \pm 2,6 \times 10^3$
PK-7-RD28	7b	RD3-MolPack24e	90	$3,7 \times 10^5 \pm 1,5 \times 10^5$	$0,074 \pm 0,039$	$38,3 \pm 11,1$	$8,5 \times 10^3 \pm 1,5 \times 10^3$
PK-7-RD28	7b	RD3-MolPack28d	80	$2,2 \times 10^5 \pm 5,4 \times 10^4$	$0,043 \pm 0,011$	$17,5 \pm 3,40$	$1,2 \times 10^4 \pm 2,1 \times 10^3$
Células de empaquetamiento RD2-MolPack	No.	Células productoras RD2-MolPack	Viabilidad (%a)	Título (TU/ml)	Título (TU/célula/día)	p24Gag (ng/ml)	Infectividad (TU/ng)
PK-7-Tat7-RD19	68b	RD2-MolPack64f	91	$0 \times 10^4 \pm 7,5 \times 10^3$	$0,056 \pm 0,009$	$40,4 \pm 4,4$	$1,8 \times 10^3 \pm 1,4 \times 10^2$

a Viabilidad de las células en el momento de la cosecha del sobrenadante (24 h después de la siembra de células). b Número de colonias escogidas después de la selección con zeocina. c Número de clones escogidos después de limitar la clonación por dilución. d Media±SEM de n=3. e Media±SEM de n=6. f Media±SEM de n=3.

5 Caracterización de las productoras RD3-MolPack-SIN-GFP

La expresión de las proteínas del vector en RD3-MolPack24 y RD2-MolPack64 se verificó mediante análisis de transferencia Western de extractos celulares y de viriones (Figura 2). Todas las proteínas se tradujeron adecuadamente en células de empaquetamiento, células productoras y se procesaron adecuadamente en las partículas virales derivadas (Figura 2a y 2b).

Transducción de linfocitos T activados con la RD3-MolPack24

La atención se centró en la transducción de linfocitos T de PB como células clave para el tratamiento de neoplasias hematológicas. Se encontró que los linfocitos T de PB activados con CD3/CD28 se transdujeron >92 % por los LV de RD3-MolPack24 a MOI = 25 y >75 % a MOI = 1,5 ya sea a los 6 o 14 días después de la transducción (Figura 3a). Por consiguiente, el VCN permaneció estable hasta 14 días después de la transducción, variando de 7,4 a 4 a MOI = 25 y MOI = 1,5, respectivamente (Figura 3b).

Luego se comparó la eficiencia de la transducción de 36 ng de p24Gag equivalentes ya sea a LV de RD3-MolPack24 (infectividad =  $9 \times 10^3$  TU/ng de p24Gag) o LV SIN-GFP-zeo pseudotipados con VSV-G derivados transitoriamente (infectividad =  $3 \times 10^5$  TU/ng de p24Gag) en células T activadas con CD3/CD28. Seis días después de la transducción, el porcentaje de células GFP+ fue casi comparable (Figura 3c), tanto en subconjuntos CD3+/CD8- como CD3+/CD8+ (Figura 4a). En contraste, en el día 14, el VCN del transgén GFP en las células T transducidas con los LV pseudotipados con RD114-TR fue tres veces menor que en las células T transducidas con los LV pseudotipados con VSV-G (Figura 3d). Lo más importante, las subpoblaciones de células T de memoria de los subconjuntos CD3+/CD8- y CD3+/CD8+ se transdujeron con idéntica eficacia mediante los dos LV con pseudotipados diferentes (Figura 4c y Figura 4d). Sin embargo, la transducción con ambos LV no afectó el fenotipo de diferenciación de las células T, que era similar a las células con transducción simulada (Figura 4b, Figura 4e y Figura 4f). Se observaron hallazgos análogos cuando los dos LV se usaron con la misma MOI (Figura 5 y 6).

Metabolismo celular de las células RD3-MolPack24 y RD2-MolPack64

Para investigar el escalado potencial de fabricación de la tecnología RD2- y RD3-MolPack, se sembraron tanto las células RD2-MolPack64 como las RD3-MolPack24 a  $1,5 \times 10^4$ /cm<sup>2</sup> en un matraz estándar y se monitorearon varios parámetros durante 7 días de cultivo continuo (Figura 7). Curiosamente, aunque los dos sistemas fueron comparables en términos de producción del LV cuando se evaluaron ya sea como TU/célula o 10 TU/ml (Figura 7a y 7b), diferían en términos de metabolismo y crecimiento. Las células RD3-MolPack64 crecieron más rápido ( $T = 25,7 \pm 1,4$  horas frente a  $T = 32,7 \pm 2,9$  SEM horas) (Figura 7c y 7e) y después de 4-7 días de cultivo su viabilidad disminuyó aumentando al mismo tiempo, el número de células viables en suspensión (Figura 7d y 7f). En conjunto, estos hallazgos indican que el sistema RD3-MolPack es preferible para el biorreactor de lecho fijo y fibra hueca, mientras que el RD2-MolPack es para la plataforma de biorreactor en suspensión.

Crecimiento a escala media de células RD3-MolPack24 y concentración de LV

Una vez establecido que las células RD3-MolPack24 eran el mejor candidato para el crecimiento adherente, se optimizaron sus condiciones de cultivo y la concentración de LV hacia la producción a mediana y gran escala. Se observó un incremento de casi 4 veces el título (de  $4,0 \times 10^5$  a  $1,5 \times 10^6$  TU/ml) después de la optimización del cultivo celular y las condiciones de cosecha y un título ligeramente más alto cuando los sobrenadantes clarificados se centrifugaron a baja velocidad en lugar de a alta velocidad (Tabla 3). Luego se inoculó  $1,7 \times 10^7$  células en el HYPERFlask™ multicapa. A partir del sexto día, cuando las células alcanzaron la concentración óptima para la producción de sobrenadante (es decir,  $2,2\text{-}2,3 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> igual a  $4 \times 10^8$  células/HYPERFlask™), se recolectó en seis cosechas independientes, casi 3 L de sobrenadante que contiene  $2,4 \times 10^9$  TU total con una infectividad media de  $7,8 \times 10^3 \pm 8,1 \times 10^2$  TU/ng p24Gag (Tabla S2). En conjunto, estos resultados son alentadores para el futuro establecimiento de la fabricación a gran escala ya sea en recipientes de apilamiento múltiple o en un biorreactor.

Tabla 3: Producción de RD3-MolPack24 en HYPERFlask™

	Tiempo de cosecha	Título (TU/ml) <sup>a</sup>	p24Gag (ng/ml) <sup>a</sup>	Infectividad (TU/ng) <sup>a</sup>	Volumen de cosecha	TU total <sup>a</sup>
5	72	4,9 x 10 <sup>5</sup>	065,5	7,4 x 10 <sup>3</sup>	500	2,4 x 10 <sup>8</sup>
	24	4,6 x 10 <sup>5</sup>	044,5	1,0 x 10 <sup>4</sup>	500	2,3 x 10 <sup>8</sup>
	24	5,8 x 10 <sup>5</sup>	071,6	8,2 x 10 <sup>3</sup>	500	2,9 x 10 <sup>8</sup>
	24	1,1 x 10 <sup>6</sup>	134,8	8,5 x 10 <sup>3</sup>	500	5,7 x 10 <sup>8</sup>
10	24	1,3 x 10 <sup>6</sup>	148,2	8,6 x 10 <sup>3</sup>	500	6,4 x 10 <sup>8</sup>
	72	1,1 x 10 <sup>6</sup>	260,6	4,1 x 10 <sup>3</sup>	400	4,3 x 10 <sup>8</sup>
<b>Total</b>					2.900	2,4 x 10 <sup>9</sup>

15 <sup>a</sup>Los valores son representativos de uno de los dos experimentos

### Células

20 Las células de riñón del embrión humano 293T (HEK-293T) y sus derivados se propagaron en medio Eagle modificado por Dulbecco modificado por Iscove (IMDM) complementado con 10 % de FCS y penicilina-estreptomina-glutamina (PSG) (Lonza, Basilea, Suiza). Las células T CEM A3.01 se cultivaron en RPMI 1640 complementado con 10 % de FCS y PSG. Las células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) se aislaron de los donantes sanos después de la centrifugación en un gradiente de Ficoll-Hypaque (Lymphoprep; Stemcell Technologies, Vancouver, Canadá) y luego se congelaron en alícuotas. Posteriormente las PBMC se descongelaron y se cultivaron en RPMI 25 1640 complementado con 10 % de FCS, PSG e IL-7 e IL-15 (5 ng/ml, cada una) (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) después de la preactivación con CD3/CD28 Dynabeads (LifeTechnologies Italia, Monza, Italia).

Producción transitoria y continua de vectores lentivirales (LV), concentración, transducción celular y cálculo de títulos

30 Los LV se obtuvieron mediante cotransfección transitoria de células HEK-293T con los plásmidos siguientes: las construcciones de empaquetamiento pCMV-ΔR8.9 (3ra generación), el plásmido pMD.G que codifica la VSV-G de envoltura o el plásmido SIN-RD114-TR que codifica la RD114-TR de envoltura, y el vector de transferencia (TV) (SIN-GFP) de 3ra generación. Los sobrenadantes se cosecharon 48 horas después de la transfección.

35 La producción continua de LV se obtuvo de manera habitual mediante el cultivo de células RD-MolPack en diferentes dispositivos de cultivo celular: matraces estándar, un pequeño biorreactor desechable e Hyperflasks. Para evaluar la productividad de las células RD-MolPack, se inocularon matraces T75 con 2,5 x 10<sup>6</sup>/cm<sup>2</sup> en 0,5 ml/cm<sup>2</sup> de IMDM complementado con 10 % de FBS y PSG y después de 24 horas se cosechó el sobrenadante. También se produjeron 40 LV en RD-MolPack mediante la inoculación de 2,5 x 10<sup>7</sup> células RD-MolPack en el biorreactor CELLLine AD 1000 (INTEGRA Biosciences AG, CH) y el reemplazo del medio del compartimento de células (15 ml de IMDM + 10 % de FCS) cada 48 horas, correspondiente a una sola cosecha, mientras que el compartimento de medio (1000 ml de IMDM + 1 % de FCS) se reemplazó semanalmente durante un máximo de 3 meses. En experimentos seleccionados, se cultivaron células RD-MolPack en Corning® HYPERFlask™ (Corning Inc. Life Science, Lowell, MA) mediante la 45 inoculación de 1,7 x 10<sup>7</sup> células/matraz y recogida del sobrenadante después de 6 días, cuando el número total de células alcanzó aproximadamente 4 x 10<sup>8</sup>. En todos los sistemas de producción, el sobrenadante cosechado se clarificó mediante filtración de 0,45 mm y se almacenó a -80 °C hasta su uso. Cuando se indicó, los sobrenadantes se concentraron 100 veces ya sea a baja velocidad (3761 x g a +4 °C durante 16 horas en una centrífuga Multifuge 32-R) o por centrifugación a alta velocidad (50 000 x g a +4 °C durante 2 horas en ultracentrífuga Beckman L-80). Los precipitados virales se resuspendieron en medio IMDM complementado con 10 % de FBS y se congelaron a -80 °C 50 para uso diferido. La transducción de la línea celular CEM A3.01 y los linfocitos T activados se realizó mediante un ciclo de espinoculación a 1024 x g durante 2 horas a 37 °C en presencia de polibreno (8 μg/ml) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO); la eficacia de la transducción se monitoreó mediante análisis de citometría de flujo (FACS Canto II Instrument, BD Bioscience, San José, CA) de GFP (SIN-GFP) mediante el software DIVA (BD Bioscience). El título de LV se calculó en células CEM A3.01 mediante el uso del intervalo de eficiencia de transducción del 5-25 % como se 55 describió anteriormente [Porcellini y otros, 2010]. La producción de partículas físicas (pp) se estimó mediante la medición de p24Gag liberado en los sobrenadantes por el kit de ELISA Alliance HIV-1 p24 Antigen (Perkin Elmer, Inc. Waltham, MA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se asume que 1 ng de p24Gag corresponde a 1 x 10<sup>7</sup> pp.

Ensayo de transferencia Western

60 Las proteínas celulares y virales, estas últimas derivadas de VLP o LV aislados libres de células, se prepararon como se describió anteriormente y luego se separaron mediante SDS-PAGE en geles prefabricados Mini-PROTEAN® TGX™ de 4-15 % (Biorad, Hercules, CA, EE.UU.). Los anticuerpos primarios usados fueron los siguientes: suero anti-VIH, obtenido de un paciente con SIDA, y amablemente donado por G. Poli (OSR, Milano, Italia) diluido 1:1000; el 65 suero de conejo anti-TM RD114-TR, amablemente proporcionado por F.L. Cosset (INSERM, Francia) diluido 1:1000; anticuerpo de ratón anti-Rev, de Santa Cruz Biotechnology (sc-69730), diluido 1:500; anticuerpo de ratón anti-Tat,

5 obtenido del NIH AIDS Research and Reference Reagent Program (EE.UU.), diluido 1:500; anticuerpo de conejo anti-actina, (A 2066) (Sigma-Aldrich), diluido 1:2500. Los anticuerpos secundarios ligados a HRP usados fueron: antihumano (NA933V) y anticonejo (NA934V) (GE Healthcare, Europe GmbH) diluidos 1:5000; antirratón (A2066) (Sigma-Aldrich) diluido 1:10 000. Para la reacción quimioluminiscente se usaron los reactivos de detección de ECL-transferencia Western (RPMN2106) (GE Healthcare).

#### Metabolismo celular de RD3-MolPack24 y RD2-MolPack64

10 Las células RD3-MolPack24 y RD2-MolPack64 se sembraron a  $1,5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> de densidad en matraces T25. Las células se contaron diariamente durante una semana y en cada punto de tiempo, los sobrenadantes se cosecharon para medir el consumo de glucosa y la producción de lactato mediante el instrumento YSI 2700 SELECT Biochemistry Analyzer (YSI, Yellow Springs, OH) y los títulos funcionales y físicos como se describió anteriormente.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un sistema para la integración estable de un vector de transferencia lentiviral autoinactivable (SIN) en una línea celular de empaquetamiento en donde dicho sistema consiste en un fragmento de ADN que comprende, a partir del extremo 5':
  - 10 i. La repetición terminal invertida del virus adenoasociado (AAV ITR)
  - ii. Un vector de transferencia lentiviral SIN
  - iii. Un promotor constitutivo que regula la expresión de un gen de resistencia a antibióticos
  - 10 iv. Un gen de resistencia a antibióticos
  - v. La repetición terminal invertida del virus adenoasociado (AAV ITR)
- 15 2. Un sistema de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el vector de transferencia lentiviral SIN comprende en la posición 5' una LTR lentiviral en el que el segmento U3 ha sido sustituido por un promotor seleccionado de CMV, CMV IE, PGK, SV40, eF1 $\alpha$  SFFV y RSV y en la posición 3', una delección de las secuencias potenciadoras y promotoras de la LTR lentiviral.
- 20 3. Un sistema de acuerdo con la reivindicación 2 en donde el segmento 5' U3 ha sido sustituido por un promotor CMV IE.
4. Un sistema de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en donde el gen de resistencia a antibióticos se selecciona del gen de resistencia a higromicina, kanamicina, neomicina, bleomicina, fleomicina o Zeocin®.
- 25 5. Un sistema de acuerdo con la reivindicación 4 en donde el gen de resistencia a antibióticos es el gen de resistencia a Zeocin®
6. Un sistema de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en donde el promotor que regula la expresión del gen de resistencia se selecciona de un promotor CMV, CMV IE, PGK, SV40, eF1 $\alpha$  SFFV y RSV.
- 30 7. Un sistema de acuerdo con la reivindicación 7 en donde el promotor que regula la expresión del gen de resistencia es un promotor SV40.
- 35 8. Un método para obtener una línea celular productora para vectores lentivirales autoinactivables (SIN) que comprende:
  - 40 i. Preparar un fragmento de ADN que comprende, a partir del extremo 5': la repetición terminal invertida del virus adenoasociado (AAV ITR), un vector de transferencia lentiviral SIN, un promotor constitutivo que regula la expresión de un gen de resistencia a antibióticos, un gen de resistencia a antibióticos y la repetición terminal invertida del virus adenoasociado (AAV ITR)
  - ii. Transfectar una línea celular de empaquetamiento para el vector lentiviral con dicho fragmento de ADN
  - iii. Seleccionar la línea celular productora mediante el cultivo de las células en presencia del antibiótico
- 45 9. Un método de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el vector de transferencia lentiviral SIN comprende en la posición 5' una LTR lentiviral en la que el segmento U3 ha sido sustituido por un promotor seleccionado de CMV, CMV IE, PGK, SV40, eF1 $\alpha$  SFFV y RSV y, en la posición 3', una delección de las secuencias potenciadoras y promotoras de la LTR lentiviral.
- 50 10. Un método de acuerdo con la reivindicación 9 en donde el segmento 5' U3 ha sido sustituido por un promotor CMV IE.
11. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 en donde el gen de resistencia a antibióticos se selecciona del gen de resistencia a higromicina, kanamicina, neomicina, bleomicina, fleomicina o Zeocin®.
- 55 12. Un método de acuerdo con la reivindicación 11 en donde el gen de resistencia a antibióticos empleado en el sistema es el gen de resistencia a Zeocin®.
- 60 13. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12 en donde el promotor que regula la expresión del gen de resistencia a antibióticos se selecciona de un promotor CMV, CMV IE, PGK, SV40, eF1 $\alpha$ , SFFV y RSV.
14. Un método de acuerdo con la reivindicación 13 en donde el promotor que regula la expresión del gen de resistencia es un promotor SV40.

15. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 14 en donde la línea celular de empaquetamiento es una línea celular de empaquetamiento estable obtenida de una línea celular hospedera que contiene en su genoma gag/pol lentiviral, rev lentiviral y una proteína de envoltura.
- 5 16. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 15 en donde la línea celular de empaquetamiento contiene además tat lentiviral integrado establemente en el genoma.
17. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 15 o 16 en donde la línea celular hospedera es una línea celular humana seleccionada de HEK293, HEK293-T, HEK293-SF, TE671, HT1080 o HeLa.
- 10 18. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17 en donde el gen env se selecciona de VSV-G env, MLV 4070 env, RD114 env, proteína de envoltura quimérica RD114-TR, proteína de envoltura quimérica RD114pro, GP64 env de baculovirus o GALV env o derivados de los mismos.
- 15 19. Una línea celular productora que se puede obtener por el método de cualquiera de las reivindicaciones 8 a 18.
20. Una línea celular productora que contiene en su genoma al menos una copia de un fragmento de ADN que comprende a partir del extremo 5':
- 20 i. La repetición terminal invertida del virus adenoasociado (AAV ITR)  
ii. Un vector de transferencia lentiviral autoinactivable (SIN)  
iii. Un promotor constitutivo que regula la expresión de un gen de resistencia a antibióticos  
iv. Un gen de resistencia a antibióticos  
v. La repetición terminal invertida del virus adenoasociado (AAV ITR).
- 25 21. Un proceso para producir vectores lentivirales autoinactivables (SIN) que comprende cultivar una línea celular productora que contiene en su genoma al menos una copia de un fragmento de ADN que comprende a partir del extremo 5':
- 30 i. La repetición terminal invertida del virus adenoasociado (AAV ITR)  
ii. Un vector de transferencia lentiviral SIN  
iii. Un promotor constitutivo que regula la expresión de un gen de resistencia a antibióticos  
iv. Un gen de resistencia a antibióticos  
v. La repetición terminal invertida del virus adenoasociado (AAV ITR).
- 35

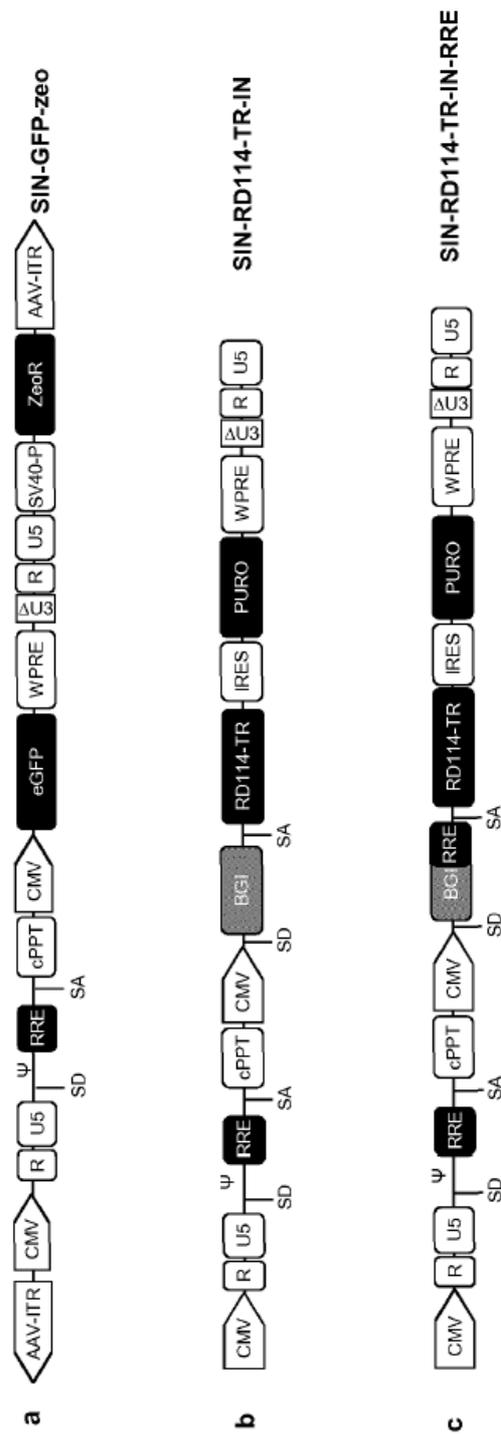
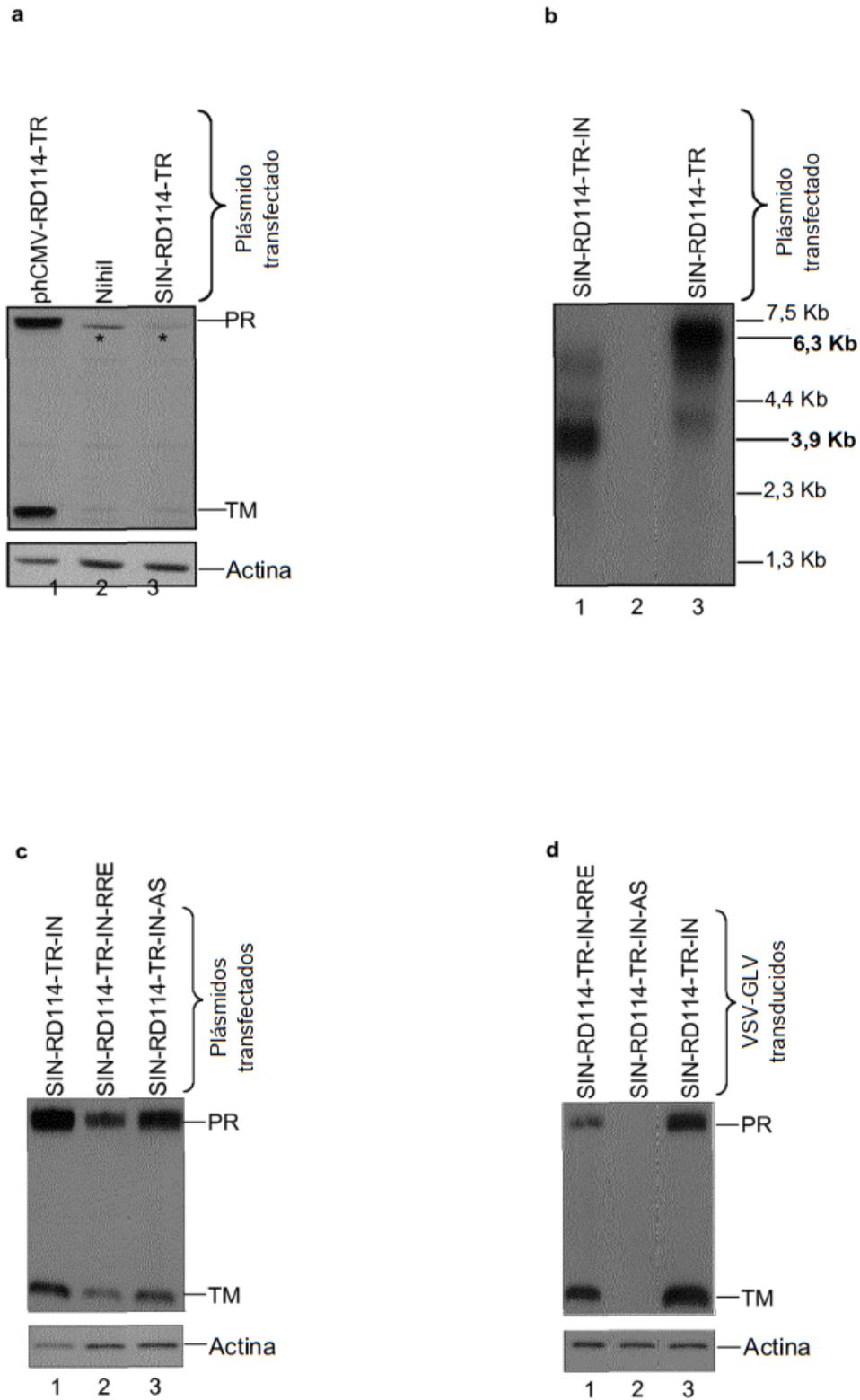


Figura 1



**Figura 2**

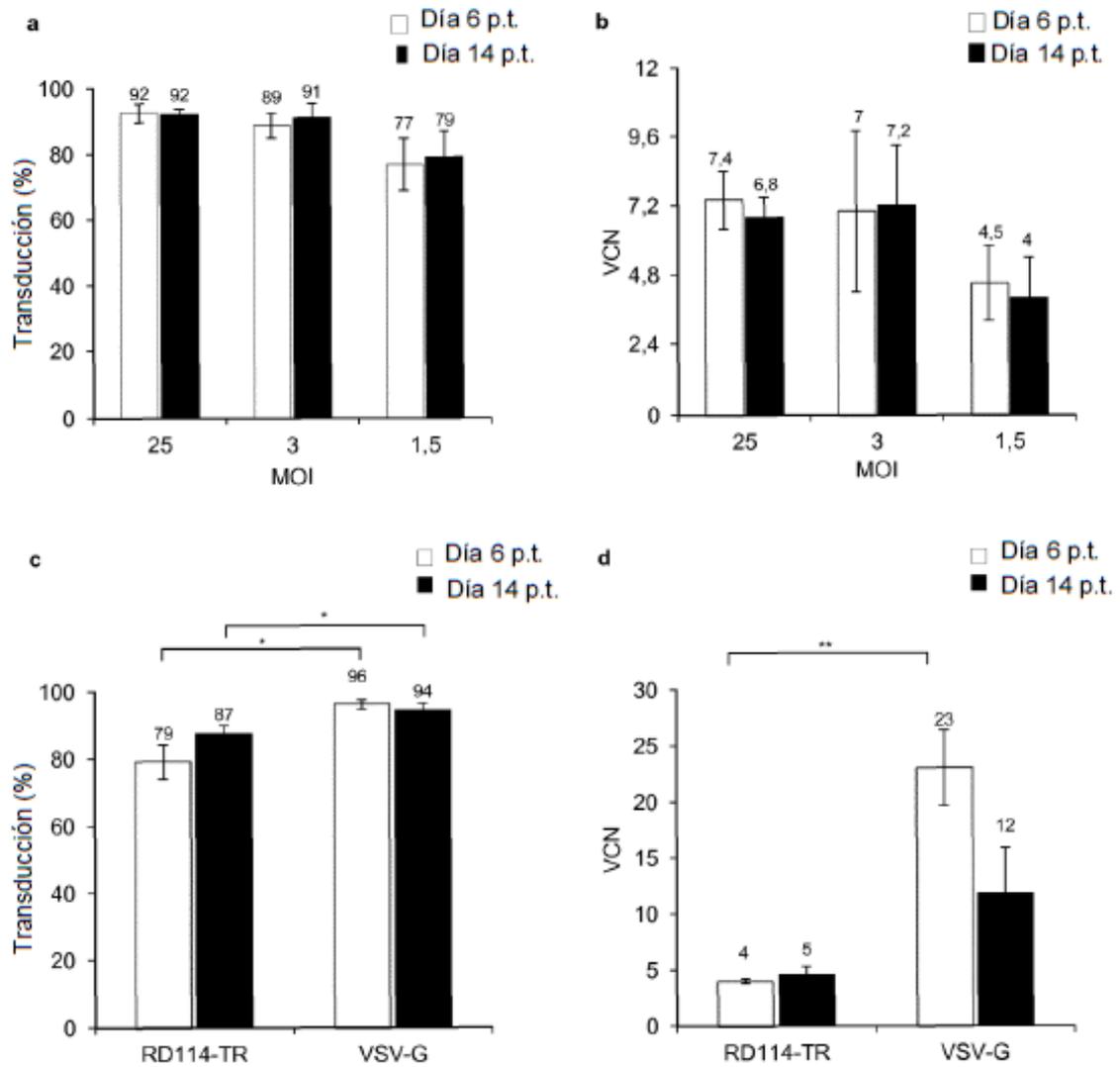


Figura 3

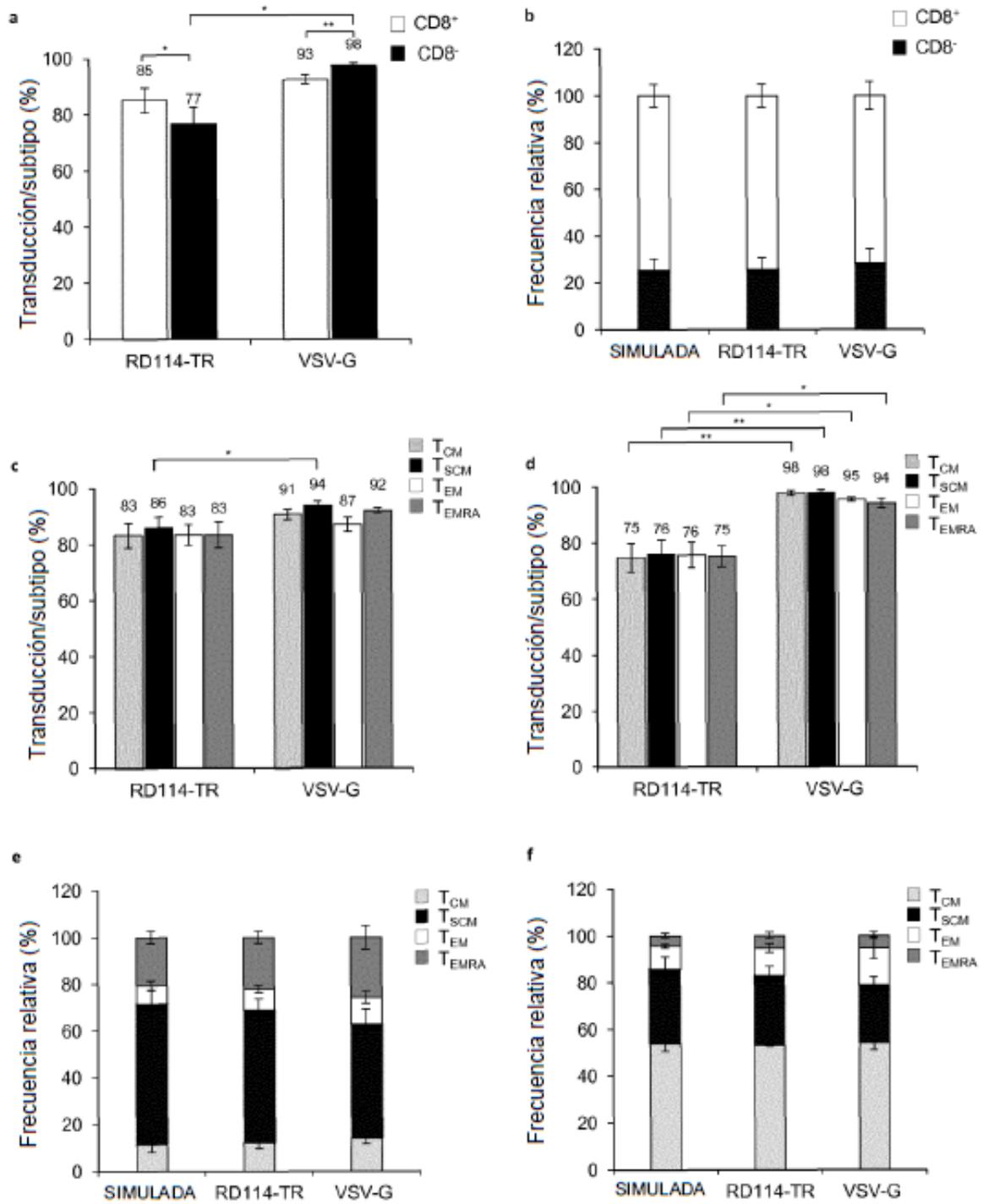


Figura 4

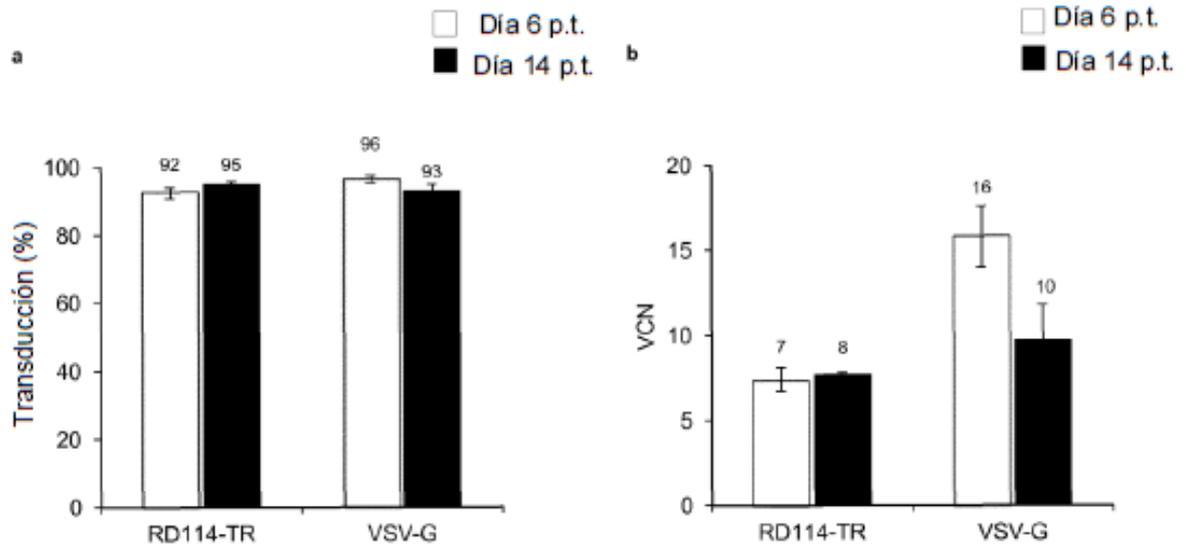


Figura 5

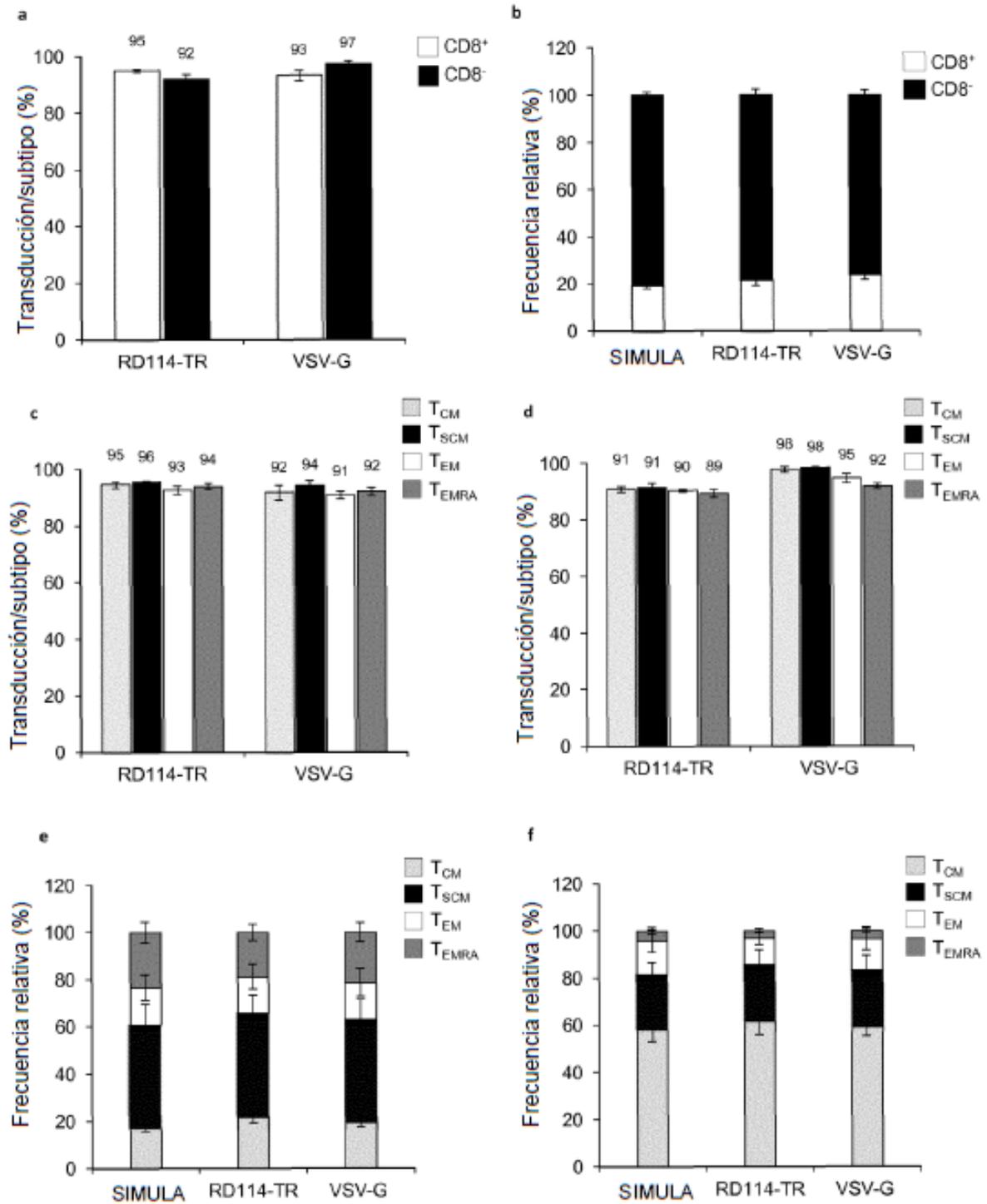


Figura 6

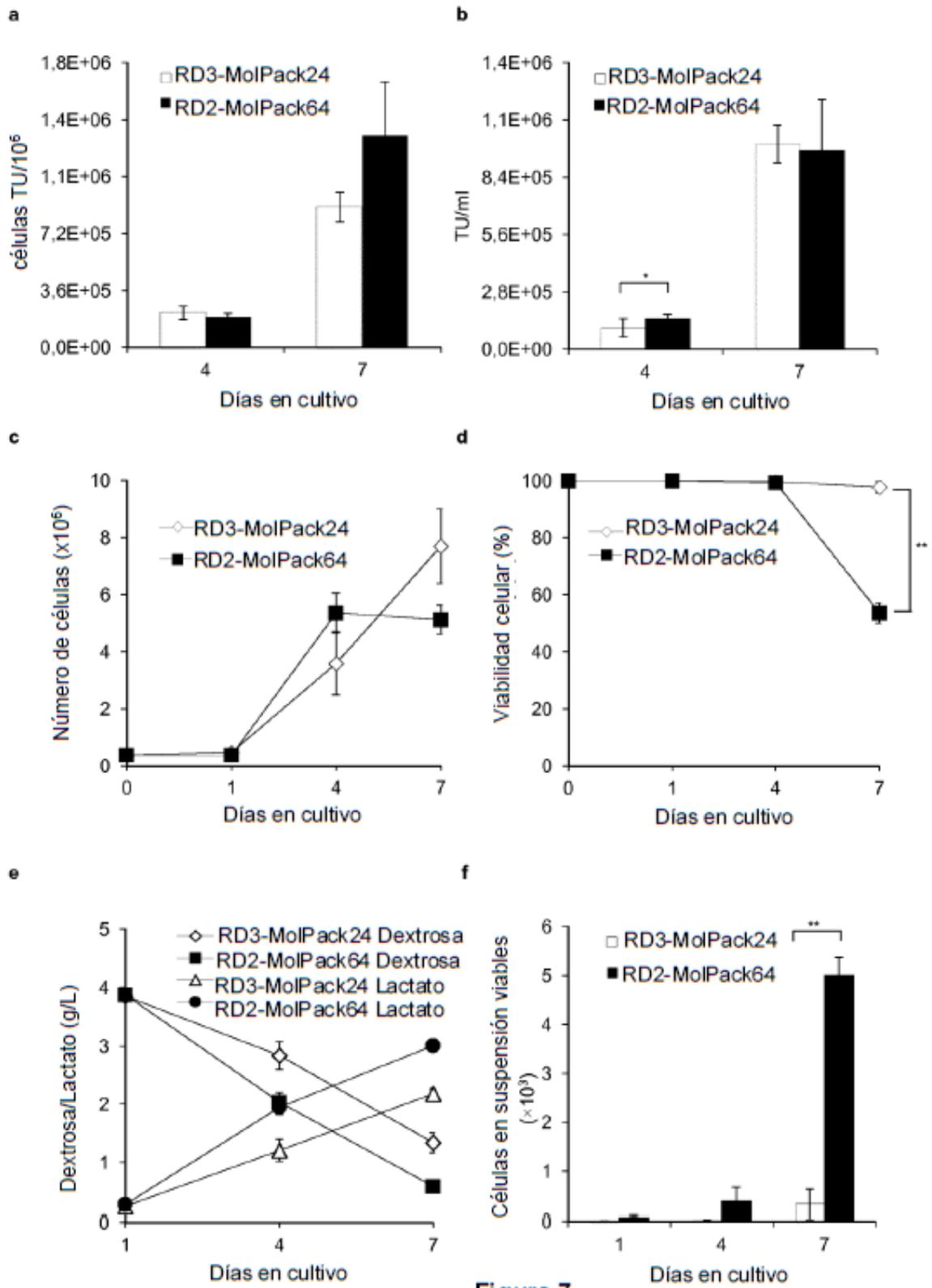


Figura 7