

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 997 865**

51 Int. Cl.:

C07K 14/005 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.10.2018 PCT/EP2018/079486**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.05.2019 WO19086351**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.10.2018 E 18803330 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2024 EP 3704136**

54 Título: **Sistema de vector retroviral basado en adaptador para la transducción selectiva de células diana**

30 Prioridad:

30.10.2017 EP 17199170

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

18.02.2025

73 Titular/es:

**MILTENYI BIOTEC B.V. & CO. KG (100.00%)
Friedrich-Ebert-Strasse 68
51429 Bergisch Gladbach, DE**

72 Inventor/es:

**SCHASER, THOMAS;
CORDES, NICOLE;
MITTELSTAET, JOERG y
KAISER, ANDREW**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 997 865 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

Sistema de vector retroviral basado en adaptador para la transducción selectiva de células diana

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al campo de partículas de vector retroviral pseudotipadas o partículas similares a vector (VLP) de las mismas, que tienen especificidad por una etiqueta en donde dicha etiqueta está acoplada a un polipéptido que se une a un antígeno expresado en una célula diana, permitiendo de ese modo la transducción dirigida de múltiples restos celulares diana con dichas partículas de vector retroviral o partículas similares a vector de las mismas.

Antecedentes de la invención

10 La administración de genes mediante vectores retrovirales es un método ampliamente usado para corregir genes defectuosos y proporcionar nuevas funciones a las células. Sin embargo, debido a la naturaleza del tipo de vectores retrovirales comúnmente usados, no son selectivos por diseño, lo que dificulta el perfil de seguridad y la aplicabilidad de los vectores retrovirales en muchos campos terapéuticos.

15 Habitualmente, los vectores retrovirales se pseudotipan con la proteína de la envuelta del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G). Este pseudotipo transduce una amplia gama de células diana, incluidos tipos de células terapéuticamente relevantes, pero puede requerir una activación previa con agentes estimulantes para alcanzar niveles suficientes de eficiencia de transducción.

Además, en poblaciones celulares mixtas, se requieren procedimientos de selección como la clasificación celular magnética para expresar el gen diana solo en el tipo celular definido. De ese modo, se evita la transducción de la población no diana que da como resultado posibles efectos secundarios.

20 Como alternativa, se sometieron a prueba intentos de diseñar sistemas de LV que sean selectivos por diseño y, por lo tanto, no requieran una preselección de la población diana. Sin embargo, estos sistemas tienen limitaciones en cuanto a selectividad, productividad o aplicabilidad.

25 El documento US20160333374 describe un sistema que se basa en fragmentos de anticuerpos como scFV que se fusionaron al ectodominio de VSV-G (VSVG-scFV). El objetivo era combinar la productividad favorable de VSV-G y la especificidad de los scFV. Este enfoque permitió la unión a antígeno diana, pero VSVG-scFV no pudo mediar en la fusión del retrovirus con la membrana de la célula diana y, en consecuencia, también la transducción. Para superar este obstáculo, VSV-G no modificado tuvo que presentarse conjuntamente con VSVG-scFV. En consecuencia, la presentación conjunta de VSV-G funcional pero no selectivo con VSV-G-scFV selectivo pero no funcional solo condujo a una transducción preferente de células que expresaban el antígeno diana. Pero lo más importante es que las células que no expresaban el antígeno diana también se transdujeron debido a la función retenida del antígeno nativo (no selectivo) VSV-G. Por lo tanto, este sistema favorece la transducción de células que expresan el antígeno diana, pero no es verdaderamente selectivo.

35 Se observó una mayor selectividad con vectores lentivirales redirigidos pseudotipados con proteínas de la envuelta del virus del sarampión (MV-LV) que comprenden una proteína con actividad de fusión (proteína F) y una proteína con actividad de unión a antígeno (proteína H) que se ha fusionado a un scFV (documento WO2008/037458A2). Además, se encontró que una mayor cantidad de proteína F troncada en comparación con la proteína H troncada dentro de las partículas de vector lentiviral generadas condujo tanto a un mayor título como a una eficiencia de transducción potenciada de dichas partículas de vector lentiviral. La amplia aplicación de este sistema se ha sometido a prueba para una variedad de antígenos *in vitro*, pero también *in vivo* (Anliker *et al.* (2010)). Sin embargo, para cada especificidad de vectores retrovirales dirigidos, se requiere una producción retroviral separada. Por lo tanto, este sistema no permite una flexibilidad total de la especificidad del vector retroviral. Además, el control de la eficiencia de transducción en la población celular seleccionada como diana de ese modo, por ejemplo, controlando la tasa de expresión del gen de interés mediante el número de copias del vector (VCN) integrado, es limitado.

45 No sólo se pseudotiparon con éxito vectores lentivirales con proteínas de la envuelta del virus del sarampión truncadas, sino también vectores gammaretrovirales (Edes (2016), Frecha *et al.* (2008)). Curiosamente, en el contexto de los vectores gammaretrovirales, el título más alto del vector retroviral se midió con variantes de truncamiento ligeramente diferentes en comparación con las variantes sometidas a prueba para el pseudotipado de vectores lentivirales. Aunque estos sistemas son funcionales, se han observado algunos inconvenientes técnicos. Por ejemplo, los títulos del vector retroviral dependen en gran medida de los niveles de expresión de superficie de la proteína quimérica H-scFV durante la producción (es decir, tras la transfección de células HEK-293T). En particular, se ha demostrado que la secuencia de la región marco del scFV influye en las propiedades biofísicas de los scFV presentados y, en consecuencia, en el título del vector retroviral funcional (Friedel *et al.* (2015)).

50 Bender *et al.* (2016), Khetawat y Broder (2010) y el documento US9486539B2 también han mostrado que las proteínas de la envuelta derivadas de otro virus Paramyxoviridae, el virus Nipah, pueden usarse también para pseudotipar vectores lentivirales y, opcionalmente, redirigirlos para la transducción selectiva.

Curiosamente, Rasbach *et al.* (2013) añadieron una proteína transmembrana no viral con función de unión a antígeno a MV-LV de modo que se usaron 3 proteínas de membrana diferentes para el pseudotipado. Usando este enfoque, la función de unión de la proteína H del sarampión se sustituyó por la proteína transmembrana no viral, pero la función auxiliar de fusión de la proteína H del sarampión seguía siendo necesaria para producir vectores lentivirales pseudotipados funcionales. La adición de otra proteína de membrana aumentó el título del vector lentiviral funcional alrededor de un orden de magnitud en comparación con los vectores lentivirales pseudotipados con solo 2 proteínas de la envuelta.

Sin embargo, todos los sistemas de vectores retrovirales pseudotipados que se han descrito anteriormente siguen teniendo un inconveniente principal: para cada especificidad de los vectores retrovirales dirigidos se requiere una producción retroviral separada, ya que deben usarse constructos de proteína de la envuelta diferentes. La producción de vectores retrovirales pseudotipados no solo es laboriosa y costosa, sino que también requiere pruebas de control de calidad por lotes para determinar el título del vector retroviral funcional. Además, estos sistemas no proporcionan soluciones altamente flexibles para cambiar instantáneamente la especificidad del vector retroviral pseudotipado ni permiten controlar la eficiencia de transducción para ajustarla a la necesidad real de la aplicación particular. Desde un punto de vista de seguridad, el control sobre los números de copias del vector integrado es deseable especialmente en un entorno clínico, donde se discuten los límites superiores del VCN.

Como alternativa, en la técnica se desarrollaron sistemas basados en adaptadores genéricos con vectores retrovirales universales que se volvieron selectivos al añadir polipéptidos diseñados por ingeniería genética específicos para el antígeno de elección (revisado en Metzner *et al.* (2013)). Por ejemplo, Roux *et al.* (1989) describen un sistema basado en adaptador en el contexto de vectores gammaretrovirales que se basa en complejos de anticuerpos biespecíficos. Un anticuerpo biotinilado específico para una partícula gammaretroviral se acopló por medio de avidina a otro anticuerpo biotinilado específico para el antígeno diana de elección expresado por las células diana. Sin embargo, los autores notaron bajos rendimientos de transducción y plantearon la hipótesis de que la especificidad sometida a prueba o el propio complejo de anticuerpos podrían explicar la eficiencia limitada que se ha observado.

Snitkovski *et al.* (2002) proporcionan un sistema alternativo que se basa en vectores retrovirales que se unen a moléculas adaptadoras recombinantes que consisten en dominios receptores extracelulares fusionados a ligandos de unión a antígeno como los scFV. En este caso, nuevamente se observaron eficiencias muy limitadas con hasta un 5 % de células diana transducidas.

Morizono *et al.* (2009) desarrollaron vectores lentivirales que presentan un dominio de proteína A que se une específicamente a la porción Fc de un anticuerpo usado como molécula adaptadora. Debido a que la afinidad de Fc por la proteína A es baja, también se evaluó la interacción biotina-avidina. Se añadió biotina a una proteína de la envuelta viral por medio de un péptido adaptador de biotina (BAP) bacteriano insertado. Los autores insertaron el péptido adaptador de biotina (BAP) en la proteína de la envuelta de direccionamiento del virus Sindbis, que es un miembro de la familia de virus Togaviridae, género alphavirus. En este caso, se usaron IgG conjugadas con avidina como adaptador. Sin embargo, la avidina también se une a moléculas cargadas de la superficie celular. Por lo tanto, como consecuencia, los anticuerpos conjugados con avidina también pueden unirse de manera inespecífica a células no diana, lo que limita su aplicabilidad.

Kaikkonen *et al.* (2009) también usaron la interacción de biotina-avidina para transducir específicamente células diana con moléculas adaptadoras. Esta vez, se aplicaron vectores retrovirales que presentaban avidina a ligandos o anticuerpos biotinilados. Se añadió avidina a un anclaje transmembrana de VSV-G para una incorporación eficiente (avidina-VSVG). Puesto que esta proteína de la envuelta recombinante solo promueve la unión pero no la fusión, se coexpresó gp64 derivada de baculovirus en la superficie del vector retroviral. Kaikkonen *et al.* (2009) eligieron adaptadores específicos para receptores sobreexpresados en células tumorales (receptor de transferrina, EGFR y CD46). Este sistema no fue verdaderamente selectivo porque gp64 se presenta conjuntamente en la envuelta del vector retroviral junto con avidina-VSVG. La adición del adaptador mejoró la transducción de la población de células diana, pero también se ha detectado una transducción inespecífica. La transducción inespecífica es especialmente crítica para todos los sistemas de vectores retrovirales adaptables que usan la interacción con biotina. Los vectores retrovirales específicos de biotina pueden unirse a la biotina de origen natural presente en la superficie celular, lo que induce la transducción inespecífica de estas células. A la inversa, las moléculas adaptadoras específicas de biotina también pueden unirse a la biotina de origen natural presente en células no diana.

Hoop (2014) usó vectores lentivirales pseudotipados con proteínas de la envuelta del virus del sarampión (MV-LV) para desarrollar un sistema de vector retroviral basado en adaptador. Esta vez, se usó la variante de proteína H truncada que reconoce el receptor nativo (es decir, sin scFV). El adaptador se diseñó de tal manera que el dominio de unión a vector lentiviral es una porción extracelular de un receptor del virus del sarampión (CD46). El fragmento de receptor soluble se fusionó a una región de unión a antígeno de células dianas por medio de un enlazador flexible (G4S)₃. Sorprendentemente, se encontró que el adaptador hacía que la partícula de LV pseudotipada fuera no selectiva: es decir, la eficiencia de transducción no solo estaba elevada en la población de células diana sino también en la población no diana que no expresa el antígeno diana del adaptador. El efecto de este adaptador es comparable a los reactivos de potenciación de la transducción comúnmente conocidos como Polybrene®, Protaminesulfate o Vectofusin-1®. Pero el modo de acción de estos reactivos es superar la repulsión de carga de la membrana viral y de la célula diana, aproximando ambas membranas y elevando los niveles de eficiencia de transducción y las tasas de transferencia génica.

El documento WO2013104728A1 divulga nuevas partículas de vector lentiviral pseudotipadas que comprenden una proteína de fusión de morbillivirus (F) y una proteína hemaglutinina (H) mutada del virus del sarampión (MeV), en donde las porciones citoplasmáticas de las proteínas F y H están truncadas, y en donde los aminoácidos necesarios para el reconocimiento del receptor en la proteína H están mutados de modo que no interactúa con CD46, SLAM y/o nectina-4 y, además, tiene un anticuerpo de cadena sencilla para un marcador de superficie celular de hESC e iPSC en su ectodominio. En esta divulgación, la secuencia codificante del fragmento variable de cadena sencilla (scFv) anti-marcador de superficie celular del anticuerpo de cadena sencilla se fusiona a la secuencia codificante en el ectodominio de la proteína H, en donde el anticuerpo de cadena sencilla se selecciona del grupo que consiste en CD30, EpCAM (CD326), CD9, Thy-1 (CD90), SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 o TRA-1-81. La transducción según esta divulgación no interfiere con la pluripotencia, es decir, las hESC y las iPSC transducidas presentes permanecen indiferenciadas, es decir, pueden diferenciarse en todos los linajes de la capa germinal. El documento WO2013104728A1 no divulga un enfoque universal para la transducción dirigida de células. Por lo tanto, las tecnologías descritas en la técnica muestran resultados en cuanto a selectividad, control o aplicabilidad, pero ninguno de estos sistemas proporciona soluciones que aborden todos estos parámetros en combinación.

En conclusión, existe la necesidad en la técnica de una tecnología de transducción alternativa y/o mejorada en el campo de los vectores retrovirales pseudotipados o partículas similares a virus de los mismos, tal como un método que aborde los parámetros mencionados anteriormente en combinación y permita una transducción controlada y selectiva de células diana con vectores retrovirales pseudotipados o partículas similares a virus de los mismos y que pueda aplicarse clínicamente.

Compendio de la invención

Los inventores descubrieron sorprendentemente que las partículas de vector retroviral o partículas similares a virus de las mismas pseudotipadas con proteínas de la envuelta del virus Paramyxoviridae, que tienen actividad de unión a antígeno y de fusión y en donde dicha proteína que tiene actividad de unión a antígeno es una proteína quimérica que no interactúa con al menos uno de sus receptores nativos, pueden usarse para generar sistemas de partículas de vector retroviral adaptables o partículas similares a virus de las mismas con alta selectividad de célula diana. Este hallazgo es sorprendente porque un enfoque alternativo que también se basó en proteínas de la envuelta derivadas de Paramyxoviridae para pseudotipado demostró claramente que tales vectores retrovirales pseudotipados se transducen de manera no selectiva en presencia de un adaptador (Hoop, 2014).

La invención se expone en el conjunto de reivindicaciones adjunto.

En una realización de la presente invención, se proporciona un sistema de vector retroviral adaptable o partículas similares a virus del mismo que también usa la interacción con biotina para unirse a la molécula adaptadora, en donde la molécula adaptadora comprende un polipéptido, por ejemplo, un anticuerpo que se une a un antígeno de una célula diana, que está acoplado a biotina por medio de un enlazador específico. La proteína de la envuelta del retrovirus, como se divulga en el presente documento, que es una partícula de vector lentiviral o gammaretroviral, se une con mayor preferencia a la biotina de la molécula adaptadora que a la biotina libre o biotina acoplada de otra manera a un resto tal como un polipéptido. Por lo tanto, en contraste con los sistemas alternativos de la técnica anterior, no hay competencia o hay menos competencia con la biotina de origen natural, evitando así, por ejemplo, una transducción limitada o inespecífica.

El descubrimiento de la presente invención hace uso de vectores retrovirales "universales" que se producen de manera más eficiente a gran escala. Al ajustar la cantidad y la especificidad del adaptador, el usuario obtiene un control total sobre el proceso de transducción de una manera ajustable únicamente en las células diana.

Por ejemplo, se crea una versión truncada recombinante de la proteína H que no interactúa con sus receptores nativos CD46, Nectin-4 y/o SLAM (mediante la introducción de mutaciones bien conocidas en la proteína H truncada) junto con un polipéptido que comprende un dominio de unión a antígeno, en donde dicho polipéptido es específico para una etiqueta de un polipéptido etiquetado y en donde dicho polipéptido etiquetado se une específicamente a un antígeno expresado en la superficie de una célula diana. Por lo tanto, el sistema adaptable de partícula de vector retroviral o partículas similares a virus de la misma como se divulga en el presente documento comprende la partícula de vector retroviral o partícula similar a virus de la misma y el polipéptido etiquetado correspondiente como se divulga en el presente documento.

Por ejemplo, la proteína F truncada media en la fusión de la membrana viral y la membrana celular de la célula diana. La proteína H truncada soporta la función de fusión pero ya no interactúa con sus receptores nativos CD46, Nectin-4 o SLAM, ya que está cegada por la introducción de las mutaciones. La parte de la proteína quimérica que comprende el polipéptido que comprende un dominio de unión a antígeno se une específicamente a una etiqueta de un polipéptido etiquetado. La etiqueta puede ser un dextrano, un hapteno como FITC y biotina o un epítipo de enlazador/etiqueta (LLE) de una molécula de unión a célula diana (TCBM) como se divulga en el presente documento. El polipéptido etiquetado puede ser, por ejemplo, un anticuerpo haptenilado o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a un antígeno que se expresa en la superficie de una célula diana, por ejemplo, un anticuerpo biotinilado específico para el antígeno de elección.

La partícula de vector retroviral o partículas similares a virus de la misma como se divulga en el presente documento, es decir, una partícula de vector lentiviral o gammaretroviral, entra por tanto en aquellas células que expresan el marcador correspondiente (antígeno) al que se une el dominio de unión a antígeno del polipéptido etiquetado, en donde la partícula de vector retroviral o partículas similares a virus de la misma se une a la etiqueta del polipéptido etiquetado por medio del polipéptido que comprende el dominio de unión a antígeno específico para la etiqueta de la proteína de unión al receptor truncada, por ejemplo, la proteína H de la partícula de vector retroviral; sin embargo, la transducción se ve alterada en células que no expresan estos marcadores (antígeno).

Asimismo, las partículas de vector retroviral o partículas similares a virus de las mismas como se divulga en el presente documento, es decir, una partícula de vector lentiviral o gammaretroviral, pueden transducir células diana que expresan el marcador correspondiente solo en presencia de dicho polipéptido. En ausencia de dicho polipéptido, la transducción de dichas partículas de vector retroviral o partículas similares a virus de las mismas se ve alterada en cualquier tipo de célula.

Por lo tanto, la entrada y transducción celular usando la partícula de vector retroviral o partículas similares a virus de la misma de la presente invención, en donde dicha partícula de vector retroviral es una partícula de vector lentiviral o gammaretroviral, ha demostrado ser un medio eficiente y eficaz para la transferencia de genes altamente selectiva a células específicas de una manera adaptable. En una realización de la invención, tales células diana se seleccionan del grupo que consiste en células inmunitarias, células hematopoyéticas, células madre, células cancerosas, células del sistema nervioso, células musculares, células progenitoras endoteliales (EPC), células endoteliales y células enfermas.

Las composiciones farmacéuticas basadas en la partícula de vector retroviral o partículas similares a virus de la misma y el/los polipéptido(s) etiquetado(s) correspondiente(s) de la presente invención pueden formularse de cualquier manera convencional usando uno o más portadores o excipientes fisiológicamente aceptables. Por lo tanto, la partícula de vector retroviral o partículas similares a virus de la misma de la presente invención pueden formularse para administración (junto con el polipéptido etiquetado o posteriormente) mediante, por ejemplo, inyección, inhalación o aislamiento (ya sea a través de la boca o la nariz) o mediante administración oral, bucal, parenteral o rectal.

La partícula de vector retroviral o partículas similares a virus de la misma y el polipéptido etiquetado de la presente invención pueden administrarse por separado o ya conjugados. La administración por separado de la partícula de vector retroviral o partículas similares a virus de la misma y el polipéptido etiquetado de la presente invención puede producirse de manera simultánea o posterior. La partícula de vector retroviral o partículas similares a virus de la misma y el polipéptido etiquetado de la presente invención pueden administrarse solo una vez o varias veces.

La partícula de vector retroviral o partículas similares a virus de la misma de la presente invención pueden administrarse primero, seguido de la administración del polipéptido etiquetado o viceversa.

Tales composiciones farmacéuticas pueden ser útiles para transducir específicamente células diana, que pueden incluir, entre otras, una célula inmunitaria, una célula cancerosa o una célula madre, con el producto génico de una proteína deseada que, si se expresa en la célula seleccionada como diana, conduce a la prevención o al tratamiento de una afección médica particular.

35 Breve descripción de los dibujos

FIG 1: Representación esquemática de la transducción mediada por adaptador

A Se pseudotipan vectores retrovirales con proteínas de la envuelta responsables de la unión a antígeno (A) y fusión (F). A se modifica de modo que no pueda interactuar con al menos uno de sus receptores nativos, como se muestra en el escudo. Para restablecer la unión a antígeno, A se fusiona en su ectodominio a un polipéptido que comprende un dominio de unión a antígeno como scFV. Es específico para una etiqueta de un polipéptido etiquetado (adaptador) y el dominio de unión a antígeno de la molécula adaptadora se une al antígeno expresado en la célula diana, lo que induce fusión y transducción.

B Transducción mediada por adaptador con proteínas de la envuelta del virus del sarampión. La proteína H (H) se ha mutado de modo que no pueda interactuar con sus receptores nativos CD46 y SLAM, como se muestra en el escudo. Se ha añadido un dominio de unión a antígeno, como un scFV específico para una etiqueta, a la H mutada. La molécula adaptadora está compuesta por un anticuerpo biotinilado específico para un antígeno expresado por la célula diana. La etiqueta comprende biotina. La eficiencia de transducción se determinó 72 h después de la transducción mediante la cuantificación de las células positivas para GFP usando citometría de flujo.

C Se representan diferentes dominios de la molécula adaptadora.

FIG 2: Representación esquemática del constructo Hmut- α -etiqueta

Elementos genéticos que codifican el constructo Hmut- α -etiqueta que incluye un scFV específico para una etiqueta con dominios variables en dos orientaciones diferentes (VH-VL o VL-VH). La proteína se expresa bajo un promotor de CMV seguido de una secuencia codificante de proteína H que se ha mutado en cuatro posiciones (representadas como un asterisco) de modo que la interacción con sus receptores nativos CD46 y SLAM ya no es posible (Hmut). La proteína H y el scFV están unidos por medio de un enlazador (G4S)₃. Los dominios variables también están conectados por medio de

un enlazador (G4S)3. Se incluye una etiqueta His con fines de detección.

FIG 3: Niveles de expresión de Hmut- α -etiqueta y unión a un polipéptido etiquetado

Se dejaron células HEK-293T sin transfectar o se transfectaron con plásmidos que codificaban Hmut- α -etiqueta (VH-VL) o Hmut- α -etiqueta (VL-VH).

5 A Expresión de superficie de Hmut- α -etiqueta determinada mediante citometría de flujo dos días después de la transfección mediante tinción con anticuerpos frente a α -His.

B La unión de Hmut- α -etiqueta a un polipéptido etiquetado se midió dos días después de la transfección usando un anticuerpo frente a α -CD25 marcado y etiquetado con fluorescencia.

FIG 4: Cuantificación de títulos de vectores retrovirales pseudotipados con Hmut- α -etiqueta.

10 A Se desarrolló un método de titulación para α -etiqueta-LV sin polipéptido etiquetado para evitar variaciones que pueden producirse, por ejemplo, debido a diferentes formatos de adaptador o por diferentes especificidades del adaptador. Las células HT1080 se biotinilaron usando biotina-LC-LC-NHS, lo que provocó una biotilación aleatoria de todas las proteínas de la superficie celular. La biotilación exitosa se confirmó mediante tinción con anticuerpos frente a α -biotina (izquierda). Las células biotiniladas se transdujeron luego con volúmenes definidos de α -etiqueta-LV que codifica GFP.
15 Tres días después de la transfección, la proporción de células positivas para GFP indica una transducción exitosa, medida mediante citometría de flujo (derecha). Se muestra un ejemplo de la estrategia de selección.

B Títulos de cribado de α -CD46-LV concentrado en células HT1080, α -CD20-LV concentrado en HT1080-CD20 y α -etiqueta-LV concentrado en células HT1080 biotiniladas.

20 FIG 5: Impacto del orden de adición del vector retroviral que codifica GFP (α -etiqueta-LV, α -CD20-LV o α -CD46-LV), polipéptido α -CD20-Ab-etiqueta (anticuerpo biotinilado específico para CD20) y células diana (Raji (positivas para CD20 y CD46) o Jurkat como control (negativas para CD20, positivas para CD46)) sobre la eficiencia de transducción. El vector retroviral se añadió a una MOI de 0,05. 72 h después de la transducción, se determinó la eficiencia de transducción mediante citometría de flujo determinando la proporción de células positivas para GFP.

25 A Se incubaron vectores lentivirales en ausencia (-) o presencia (+) del polipéptido etiquetado durante 30 minutos a 4 °C. Posteriormente, la mezcla preincubada LV/ α -CD20-Ab-etiqueta se añadió a las células o las células se dejaron sin transducir (sin).

B Se preincubaron células Raji y Jurkat en ausencia (-) o presencia (+) de α -CD20-Ab-etiqueta durante 30 minutos a 4 °C. La mezcla preincubada de células/ α -CD20-Ab-etiqueta se dejó sin transducir o se transdujo.

30 C Se preincubaron células Raji y Jurkat con el vector lentiviral durante 30 min a 37 °C o sin el vector retroviral (sin). Posteriormente, se añadió α -CD20-etiqueta (+) o no se complementó (-).

FIG 6: Evaluación de reactivos de potenciación de la transducción en cuanto a selectividad y eficiencia de transducción. Se preincubaron células Raji (positivas para CD20 y CD46) o Jurkat (negativas para CD20, positivas para CD46) con (+) o sin (-) el polipéptido α -CD20-Ab-etiqueta durante 30 min a 4 °C seguido de la adición de α -etiqueta-LV, α -CD20-LV o α -CD46-LV (MOI=0,05). El polipéptido etiquetado era un anticuerpo biotinilado y la etiqueta usada comprende biotina. La eficiencia de transducción se determinó 72 h después de la transducción mediante cuantificación de las células positivas para GFP usando citometría de flujo.
35

A No se añadió ningún reactivo de potenciación de la transducción.

B Se añadió Polybrene® como potenciador de la transducción.

C Se añadió Vectofusin-1® como potenciador de la transducción.

40 FIG 7: Expansión de las especificidades del polipéptido etiquetado a CD4, CD8, CD19, CD20 y CD46. Se incubaron células diana que expresaban o no el antígeno diana en ausencia (-) o presencia (+) del polipéptido α -CD4-Ab-etiqueta, α -CD8-Ab-etiqueta, α -CD19-Ab-etiqueta, α -CD20-Ab-etiqueta o α -CD46-Ab-etiqueta, respectivamente, durante 30 min a 4 °C. El polipéptido etiquetado era un anticuerpo biotinilado y la etiqueta usada comprende biotina. Se aplicó α -etiqueta-LV que codifica GFP a una MOI de 0,05 en presencia de Vectofusin-1®. Tres días después de la transducción, las células se tiñeron con anticuerpos específicos para el mismo antígeno que el polipéptido etiquetado usado y se determinó la eficiencia de transducción mediante la cuantificación de células positivas para GFP usando citometría de flujo. Para transducciones de células que expresan el antígeno correspondiente del polipéptido etiquetado, la tasa de transducción se refiere a todas las células que expresan el antígeno diana. Para transducciones de células que no expresan el antígeno correspondiente del polipéptido etiquetado, la tasa de transducción se refiere a todas las células que no expresan el antígeno diana.
45
50

A Se usaron células SupT1 (positivas para CD4, CD8 y CD46; negativas para CD19 y CD20).

B Se usaron células Jurkat (positivas para CD4 y CD46; negativas para CD8, CD19 y CD20).

C Células HT1080 (positivas para CD46, negativas para CD4, CD8, CD19, CD20).

D Células Raji (positivas para CD19, CD20 y CD46; negativas para CD4 y CD8).

5 FIG 8: Selectividad en poblaciones celulares mixtas con células que expresan el antígeno diana y células que no lo expresan. El polipéptido etiquetado era un anticuerpo biotinilado y la etiqueta usada comprende biotina. Se mezclaron células Raji (positivas para CD19, CD20 y CD46; negativas para CD4 y CD8) en partes iguales con células SupT1 (positivas para CD4, CD8 y CD46; negativas para CD19 y CD20).

10 A Se transdujeron células cocultivadas con α -etiqueta-LV que codifica GFP (MOI=0,05, incluyendo Vectofusin-1[®]) en presencia (transducción con adaptador) o ausencia (transducción sin adaptador) del polipéptido etiquetado específico para el antígeno como se indica en la parte superior. Como control, las células cocultivadas se dejaron sin transducir. Tres días después de la transducción, las células se tiñeron con anticuerpos específicos para el mismo antígeno que el polipéptido etiquetado y se determinó la eficiencia de transducción mediante la cuantificación de células positivas para GFP usando citometría de flujo.

15 B Cuantificación de los datos citométricos de flujo de A. La tasa de células negativas para GFP y positivas para GFP se muestra por separado para células que no expresan o para células que expresan el antígeno diana del polipéptido etiquetado.

FIG 9: Selectividad en condiciones propensas a inducir transducción inespecífica.

20 El polipéptido etiquetado era un anticuerpo biotinilado y la etiqueta usada comprende biotina. Tres días después de la transducción, se determinó la eficiencia de transducción mediante la cuantificación de células positivas para GFP usando citometría de flujo.

A Transducción en presencia de suero. Se transdujeron células Raji positivas para CD20 y células Jurkat negativas para CD20 con Vectofusin-1[®] en medio suplementado con FCS al 10 % con α -etiqueta-LV que codifica GFP (MOI 0,05) en presencia (+) o ausencia (-) del polipéptido α -CD20-Ab-etiqueta.

25 B Transducción con polipéptidos con o sin etiqueta. Se transdujeron células Raji positivas para CD20 con Vectofusin-1[®] con α -etiqueta-LV que codifica GFP (MOI 0,05) con el polipéptido α -CD20-Ab-etiqueta o α -CD20-Ab.

C Transducción con cantidades elevadas de vector retroviral. Las células Raji (positivas para CD20 y CD46) y las células Jurkat (negativas para CD20, positivas para CD46) se dejaron sin transducir (sin) o se transdujeron con Vectofusin-1[®] a una MOI de 0,4 con α -etiqueta-LV, α -CD20-LV o α -CD46-LV en presencia (+) o ausencia (-) de α -CD20-Ab-etiqueta.

30 FIG 10: Titulación del polipéptido etiquetado para determinar la concentración óptima de molécula adaptadora. El polipéptido etiquetado era un anticuerpo biotinilado y la etiqueta usada comprende biotina. Tres días después de la transducción, se determinó la eficiencia de transducción mediante la cuantificación de células positivas para GFP usando citometría de flujo.

35 A Se transdujeron células Jurkat (positivas para CD4, baja expresión) con α -etiqueta-LV que codifica GFP con Vectofusin-1[®] a una MOI de 0,05 en presencia del polipéptido etiquetado α -CD4-Ab-etiqueta en las concentraciones indicadas.

B Se transdujeron células B Raji (positivas para CD20, alta expresión) con α -etiqueta-LV que codifica GFP con Vectofusin-1[®] a una MOI de 0,05 con α -CD20-Ab-etiqueta en las concentraciones indicadas.

40 FIG 11: Evaluación de un formato de adaptador alternativo: fragmentos etiquetados de anticuerpos (Fab). El polipéptido etiquetado era un fragmento Fab biotinilado y la etiqueta usada comprende biotina. Tres días después de la transducción, se determinó la eficiencia de transducción mediante la cuantificación de células positivas para GFP usando citometría de flujo.

A Se transdujeron células Raji positivas para CD19 con α -etiqueta-LV que codifica GFP con Vectofusin-1[®] a una MOI de 0,05 en ausencia (sin) o presencia de α -CD4-Fab-etiqueta, α -CD8-Fab-etiqueta o α -CD19-Fab-etiqueta etiquetado 1 μ g/ml.

45 B Se transdujeron células SupT1 positivas para CD4 y CD8 con α -etiqueta-LV que codifica GFP con Vectofusin-1[®] a una MOI de 0,05 en ausencia (sin) o presencia de α -CD4-Fab-etiqueta, α -CD8-Fab-etiqueta o α -CD19-Fab-etiqueta etiquetado 1 μ g/ml.

50 FIG 12: Evaluación de un formato de adaptador alternativo: dextrano como etiqueta de un polipéptido etiquetado. El polipéptido etiquetado era un fragmento Fab acoplado a dextrano y la etiqueta es dextrano. Un scFV específico para dextrano se fusionó con Hmut usado para el pseudotipado.

Se transdujeron células Raji positivas para CD19 con α -etiqueta-LV que codifica GFP con Vectofusin-1[®] en ausencia (sin adaptador) o presencia de α -CD19-Fab etiquetado o α -CD4-Fab etiquetado. Tres días después de la transducción, se determinó la eficiencia de transducción mediante la cuantificación de células positivas para GFP usando citometría de flujo.

5 FIG 13: Adaptador-LV que usa proteínas de la envuelta de Nipah para pseudotipado: se incubaron células Raji positivas para CD19, positivas para CD20, negativas para CD4 en ausencia (sin) de cualquier adaptador o en presencia del adaptador etiquetado α -CD4-Ab-etiqueta, α -CD19-Ab-etiqueta, α -CD20-Ab-etiqueta, o adaptador sin ninguna etiqueta α -CD20-Ab o α -CD19-Ab, respectivamente, durante 30 min a 4 °C. El polipéptido etiquetado era un anticuerpo biotinilado y la etiqueta usada era biotina. Se aplicó α -etiqueta-LV que codifica GFP a una MOI de 0,25. Tres días después de la transducción, se determinó la eficiencia de transducción mediante la cuantificación de células positivas para GFP usando citometría de flujo.

10 FIG 14: Transferencia de proteínas mediada por adaptador-VLP: se incubaron células SupT1 positivas para CD4, positivas para CD8, negativas para CD20 en ausencia de cualquier polipéptido (sin) o en presencia del polipéptido etiquetado o no etiquetado α -CD4, α -CD8 o α -CD20, respectivamente, durante 30 min a 4 °C. El polipéptido etiquetado era un anticuerpo biotinilado y la etiqueta usada comprendía biotina. Se aplicaron α -etiqueta-VLP sin integrar en el genoma viral que portaban GFP o proteína fluorescente roja monomérica a una MOI de 0,05. Cuatro horas después de la adición de VLP, se determinó la eficiencia de transferencia de proteínas mediante la cuantificación de células positivas para GFP o proteína fluorescente roja monomérica usando citometría de flujo.

Descripción detallada de la invención

20 La presente invención proporciona un sistema de transducción adaptable, es decir, una composición, para partículas de vector retroviral o partículas similares a virus de las mismas para seleccionar como diana antígenos diferentes y variables en células diana en presencia tanto del vector retroviral o partícula similar a virus del mismo que puede unirse a una etiqueta como del polipéptido etiquetado correspondiente que puede unirse a un antígeno expresado en una célula diana, en donde dicha partícula de vector retroviral es una partícula de vector lentiviral o gammaretroviral.

25 En un primer aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende

i) una partícula de vector retroviral pseudotipada o partícula similar a virus de la misma que comprende:

30 a) una proteína de la envuelta con actividad de unión a antígeno, en donde dicha proteína de la envuelta es una proteína recombinante que no interactúa con al menos uno de sus receptores nativos y está fusionada en su ectodominio a un polipéptido que comprende un dominio de unión a antígeno específico para una etiqueta de un polipéptido etiquetado, y en donde dicha proteína de la envuelta es la proteína H de un virus de la familia Paramyxoviridae, en donde dicha proteína H de un virus de la familia Paramyxoviridae carece de al menos una parte de la región citoplasmática de dicha proteína H,

35 b) una proteína de la envuelta con actividad de fusión de un virus de la familia Paramyxoviridae, en donde dicha proteína de la envuelta con actividad de fusión carece de al menos una parte de la región citoplasmática de dicha proteína de la envuelta, y

ii) dicho polipéptido etiquetado, en donde dicho polipéptido etiquetado se une específicamente a un antígeno expresado en la superficie de una célula diana, transduciendo de ese modo la célula diana con dicha partícula de vector retroviral o induciendo de ese modo la captación de la partícula similar a virus en la célula diana,

40 en donde dicho virus Paramyxoviridae es un virus del género *morbillivirus*, y en donde dicha partícula de vector retroviral es una partícula de vector lentiviral o gammaretroviral.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende

i) una partícula de vector retroviral pseudotipada o partícula similar a virus de la misma que comprende:

45 a) una proteína de la envuelta con actividad de unión a antígeno, en donde dicha proteína de la envuelta es una proteína recombinante que no interactúa con al menos uno de sus receptores nativos y está fusionada en su ectodominio a un polipéptido que comprende un dominio de unión a antígeno específico para una etiqueta de un polipéptido etiquetado, y en donde dicha proteína de la envuelta es la proteína G de un virus de la familia Paramyxoviridae, en donde dicha proteína G de un virus de la familia Paramyxoviridae carece de al menos una parte de la región citoplasmática de dicha proteína G,

50 b) una proteína de la envuelta con actividad de fusión de un virus de la familia Paramyxoviridae, en donde dicha proteína de la envuelta con actividad de fusión carece de al menos una parte de la región citoplasmática de dicha proteína de la envuelta, y

ii) dicho polipéptido etiquetado, en donde dicho polipéptido etiquetado se une específicamente a un antígeno expresado en la superficie de una célula diana, transduciendo de ese modo la célula diana con dicha partícula de vector retroviral o induciendo de ese modo la captación de la partícula similar a virus en la célula diana,

5 en donde dicho virus Paramyxoviridae es un virus del género *Henipavirus*, y en donde dicha partícula de vector retroviral es una partícula de vector lentiviral o gammaretroviral.

Dichos vectores retrovirales pseudotipados o partículas similares a virus de los mismos pueden fusionarse por medio de un enlazador al ectodominio de dicha proteína recombinante que no interactúa con al menos uno de sus receptores nativos.

10 En una realización preferida de la invención, se inhibe la interacción con todos los receptores nativos de dicha proteína recombinante, entonces la presente invención proporciona una combinación de

i) una partícula de vector retroviral pseudotipada o partícula similar a virus de la misma que comprende:

15 a) una proteína de la envuelta con actividad de unión a antígeno, en donde dicha proteína de la envuelta es una proteína recombinante que no interactúa con su(s) receptor(es) nativo(s) y está fusionada en su ectodominio a un polipéptido que comprende un dominio de unión a antígeno específico para una etiqueta de un polipéptido etiquetado, y en donde dicha proteína de la envuelta es la proteína H de un virus de la familia Paramyxoviridae, en donde dicha proteína H de un virus de la familia Paramyxoviridae carece de al menos una parte de la región citoplasmática de dicha proteína H,

20 b) una proteína de la envuelta con actividad de fusión de un virus de la familia Paramyxoviridae, en donde dicha proteína de la envuelta con actividad de fusión carece de al menos una parte de la región citoplasmática de dicha proteína de la envuelta, y

25 ii) dicho polipéptido, en donde dicho polipéptido etiquetado se une específicamente a un antígeno expresado en la superficie de una célula diana, transduciendo de ese modo la célula diana con dicha partícula de vector retroviral o induciendo de ese modo la captación de la partícula similar a virus en la célula diana, en donde dicho virus Paramyxoviridae es un virus del género *morbillivirus*, y en donde dicha partícula de vector retroviral es una partícula de vector lentiviral o gammaretroviral.

En una realización preferida de la invención, se inhibe la interacción con todos los receptores nativos de dicha proteína recombinante, entonces la presente invención proporciona una combinación de

i) una partícula de vector retroviral pseudotipada o partícula similar a virus de la misma que comprende:

30 a) una proteína de la envuelta con actividad de unión a antígeno, en donde dicha proteína de la envuelta es una proteína recombinante que no interactúa con su(s) receptor(es) nativo(s) y está fusionada en su ectodominio a un polipéptido que comprende un dominio de unión a antígeno específico para una etiqueta de un polipéptido etiquetado, y en donde dicha proteína de la envuelta es la proteína G de un virus de la familia Paramyxoviridae, en donde dicha proteína G de un virus de la familia Paramyxoviridae carece de al menos una parte de la región citoplasmática de dicha proteína G,

35 b) una proteína de la envuelta con actividad de fusión de un virus de la familia Paramyxoviridae, en donde dicha proteína de la envuelta con actividad de fusión carece de al menos una parte de la región citoplasmática de dicha proteína de la envuelta, y

40 ii) dicho polipéptido etiquetado, en donde dicho polipéptido etiquetado se une específicamente a un antígeno expresado en la superficie de una célula diana, transduciendo de ese modo la célula diana con dicha partícula de vector retroviral o induciendo de ese modo la captación de la partícula similar a virus en la célula diana, en donde dicho virus Paramyxoviridae es un virus del género *Henipavirus*, y en donde dicha partícula de vector retroviral es una partícula de vector lentiviral o gammaretroviral.

En otra realización de la presente invención, se inhibe la interacción con el/los receptor(es) usado(s) principalmente para la entrada celular. En otra realización de la presente invención, se inhibe la interacción con al menos un receptor.

45 Además, los fragmentos de anticuerpo como los scFV pueden requerir secuencias de enlazador para fusionar ambas cadenas de dicho scFV. La generación de proteínas recombinantes que contienen dominios o fragmentos que se han fusionado a otros dominios usando polipéptidos enlazadores se describe bien en la técnica (por ejemplo, Chen *et al.* (2013)). El enlazador prototipo es el enlazador (G4S)₃ que también se usa a modo de ejemplo en la presente invención, pero no se pretende ninguna restricción a este enlazador prototipo ya que otras secuencias de enlazador también pueden ser funcionales en el contexto de la presente invención.

50 Dicha etiqueta de dicho polipéptido etiquetado no se expresa en ninguna célula de ninguna especie (células diana y células no diana) de un sujeto o de un cultivo celular en el que dicho vector retroviral o partícula similar a virus del mismo se aplica para la transducción, por ejemplo en un ser humano. Como consecuencia, dicho vector retroviral o partícula similar a virus del mismo solo puede transducir cualquier célula diana en presencia de dicho polipéptido etiquetado. Las células no diana además no se transducen en presencia de dicho polipéptido etiquetado.

- Dicha partícula de vector retroviral pseudotipada o partícula similar a virus de la misma, en donde dicha proteína de la envuelta con actividad de unión a antígeno no se une a ningún antígeno de la célula diana sin dicho polipéptido etiquetado.
- 5 Dicha partícula de vector retroviral pseudotipada o partícula similar a virus de la misma, en donde dicha transducción o dicha captación inducida puede ser al menos 2 veces mayor, 5 veces mayor, 10 veces mayor, 25 veces mayor, 50 veces mayor, 100 veces mayor, 1000 veces mayor, 2000 veces mayor o 5000 veces mayor en dichas células diana en presencia de dicho polipéptido etiquetado en comparación con dicha transducción o dicha captación inducida en dichas células diana en ausencia de dicho polipéptido etiquetado.
- 10 Dicha partícula de vector retroviral pseudotipada o partícula similar a virus de la misma, en donde ninguna célula humana se transduce sin dicho polipéptido etiquetado.
- Dicha partícula de vector retroviral pseudotipada o partícula similar a virus de la misma, en donde la generación, el uso y la administración de dicha partícula de vector retroviral pseudotipada o partícula similar a virus de la misma pueden realizarse en un entorno de menor riesgo ya que ninguna célula humana se transduce sin dicho polipéptido etiquetado.
- 15 Dicha partícula de vector retroviral pseudotipada o partícula similar a virus de la misma, en donde ninguna célula de ninguna especie (células diana y células no diana) puede transducirse sin dicho polipéptido etiquetado.
- Dicha partícula de vector retroviral pseudotipada o partícula similar a virus de la misma, en donde el antígeno al que se une dicho polipéptido etiquetado se expresa de forma transitoria.
- 20 Dicha partícula de vector retroviral pseudotipada o partícula similar a virus de la misma, en donde el antígeno al que se une dicho polipéptido etiquetado puede expresarse de forma transitoria, dependiendo de la fase del ciclo celular o del estado de activación y/o diferenciación.
- Dicha partícula de vector retroviral pseudotipada o partícula similar a virus de la misma, en donde la expresión del antígeno al que se une dicho polipéptido etiquetado puede ser controlable, por ejemplo, mediante expresión inducible.
- 25 Dicha partícula de vector retroviral pseudotipada o partícula similar a virus de la misma, en donde dicha transducción o dicha captación inducida puede ser al menos 2 veces mayor, 5 veces mayor, 10 veces mayor, 25 veces mayor, 50 veces mayor, 100 veces mayor, 1000 veces mayor, 2000 veces mayor o 5000 veces mayor en dichas células diana que en células no diana.
- 30 El pseudotipado de vectores retrovirales con proteínas de la envuelta derivadas de Paramyxoviridae se describe bien en la técnica. Para un pseudotipado eficiente de vectores retrovirales con proteínas de la envuelta derivadas del género *morbillivirus*, la porción citoplasmática truncada de la proteína F debe comprender al menos 1 residuo de aminoácido cargado positivamente y no más de 9 residuos de aminoácidos consecutivos contados desde el extremo N-terminal de la porción citoplasmática de la proteína F y la porción citoplasmática truncada de la proteína H debe comprender al menos 9 y no más de 19 residuos de aminoácidos consecutivos contados desde el extremo C-terminal de la porción citoplasmática de la proteína H más una metionina adicional en el extremo N-terminal (Frecha *et al.* (2008), documento EP2066795B9, Edes (2016)). Por lo tanto, los vectores lentivirales y los vectores gammaretrovirales se pseudotipan de manera eficiente usando variantes de proteínas F y H truncadas como se describió anteriormente.
- 35 Varios informes muestran que los vectores retrovirales también pueden pseudotiparse con proteínas de la envuelta del virus Nipah. Es un virus derivado de la familia Paramyxoviridae, subfamilia Paramyxovirinae, género *Henipavirus*. Otro miembro de este género es Hendravirus. A diferencia de la proteína H del *morbillivirus*, la proteína de la envuelta de Nipah con función de unión a antígeno es la proteína G. No tiene función hemaglutinante pero también es una proteína de membrana de tipo II. Aunque el dominio citoplasmático de la proteína G es bastante largo y, por lo tanto, potencialmente requiere deleciones más grandes dentro del dominio citoplasmático para un pseudotipado eficiente, varios informes muestran datos de diferentes truncamientos y títulos funcionales incluso sin ningún truncamiento dentro del dominio citoplasmático de la proteína G (Khetawat *et al.* (2010), Bender *et al.* (2016) Palomares *et al.* (2013)). Para la proteína F de Nipah, se ha hecho una observación similar que indica que, para ambas proteínas de la envuelta del virus, los truncamientos de los dominios citoplasmáticos son menos críticos para producir títulos de vectores retrovirales funcionales. Sin embargo, Bender *et al.* (2016) han demostrado que el título de vector retroviral más alto se detectó cuando se usaron constructos con los 11 aminoácidos restantes más metionina en el dominio citoplasmático de la proteína G y los 6 ácidos restantes en el dominio citoplasmático de la proteína F. Por el contrario, Khetawat *et al.* (2010) han observado el título de vector retroviral más alto con la versión no truncada de la proteína G y 4 ácidos restantes en el dominio citoplasmático de la proteína F. Los resultados de Palomares *et al.* (2013) indican que la versión no truncada o la versión con 35 o 20 aminoácidos restantes más metionina en el dominio citoplasmático de la proteína G en combinación con 6 aminoácidos restantes más 6 aminoácidos adicionales de la proteína F de Nipah dieron como resultado los títulos de vector retroviral más altos.

- Además, los vectores lentivirales se pseudotiparon con éxito con proteínas de la envuelta derivadas de otro virus de la familia Paramyxoviridae : el virus Tupaia (Enkrich *et al.* (2013)). Está relacionado con *morbillivirus* y *henipavirus* pero no se le asignó a uno de estos géneros porque es genéticamente muy diferente. Aunque la diferencia genética es demasiado alta, es necesario un truncamiento comparable del dominio citoplasmático como en el caso de las proteínas de la envuelta de *morbillivirus* para permitir el pseudotipado con alta eficiencia: los 6 aminoácidos restantes del dominio citoplasmático de la proteína F y los 13 aminoácidos restantes más la metionina en el dominio citoplasmático de la proteína H dieron como resultado el título de vector retroviral más alto.
- 5 Dicha partícula de vector retroviral pseudotipada o partícula similar a virus de la misma, en donde dicha proteína derivada de la proteína H o F del virus del sarampión carece de al menos una parte de la región citoplasmática de dicha proteína H o F, es decir, dicha proteína H o F puede ser una proteína truncada.
- 10 Dicha partícula de vector retroviral pseudotipada o partícula similar a virus de la misma, en donde dicha proteína derivada de la proteína G o F del virus Nipah carece de al menos una parte de la región citoplasmática de dicha proteína G o F, es decir, dicha proteína G o F puede ser una proteína truncada.
- 15 Dicha partícula de vector retroviral pseudotipada o partícula similar a virus de la misma, en donde dicho *morbillivirus* es un virus del sarampión o la cepa Edmonston del virus del sarampión.
- Dicha partícula de vector retroviral o partícula similar a virus de la misma, en donde dicho *Henipavirus* es un virus Nipah.
- Dicha partícula de vector retroviral o partícula similar a virus de la misma, en donde la partícula de vector retroviral pseudotipada o partícula similar a virus de la misma se deriva de un lentivirus seleccionado del grupo que consiste en VIH-1, VIH-2, SIVmac, SIVpbj, SIVagm, FIV y EIAV.
- 20 Dicha partícula de vector retroviral o partícula similar a virus de la misma, en donde la partícula de vector retroviral pseudotipificada o partícula similar a virus de la misma se deriva de un gammaretrovirus seleccionado del grupo que consiste en el virus de la leucemia felina, el virus de la leucemia del simio gibón (GALV) y el virus de la leucemia murina (MLV).
- 25 Dicha partícula de vector retroviral o partícula similar a virus de la misma, en donde las porciones citoplasmáticas de dichas proteínas F y H están truncadas por delección de residuos de aminoácidos de dichas porciones citoplasmáticas, y en donde la porción citoplasmática truncada de la proteína F comprende al menos 1 residuo de aminoácido cargado positivamente y no más de 9 residuos de aminoácidos consecutivos contados desde el extremo N-terminal de la porción citoplasmática de la proteína F, en donde la porción citoplasmática truncada de la proteína H comprende al menos 9 y no más de 19 residuos de aminoácidos consecutivos contados desde el extremo C-terminal de la porción citoplasmática de la proteína H más una metionina adicional en el extremo N-terminal.
- 30 Dicha porción citoplasmática truncada de la proteína H está truncada para permitir un pseudotipado eficiente y tiene función de soporte de fusión.
- Dicha partícula de vector retroviral o partícula similar a virus de la misma, en donde dicha partícula comprende una proteína de fusión (F) y una proteína hemaglutinina (H) de un *morbillivirus*, en donde las porciones citoplasmáticas de dichas proteínas F y H están truncadas por delección de residuos de aminoácidos de dichas porciones citoplasmáticas y en donde la porción citoplasmática truncada de la proteína F comprende al menos 1 residuo de aminoácido cargado positivamente y no más de 9 residuos de aminoácidos consecutivos contados desde el extremo N-terminal de la porción citoplasmática de la proteína F, la porción citoplasmática truncada de la proteína H está truncada para permitir un pseudotipado eficiente y tiene una función de soporte de fusión, en donde la porción citoplasmática truncada de la proteína H comprende al menos 9 y no más de 19 residuos de aminoácidos consecutivos contados desde el extremo C-terminal de la porción citoplasmática de la proteína H más una metionina adicional en el extremo N-terminal, y en donde la proteína H truncada es una proteína quimérica que no interactúa con CD46, SLAM y además tiene en su ectodominio un polipéptido que comprende un dominio de unión a antígeno específico para una etiqueta de un polipéptido etiquetado, y en donde dicho polipéptido etiquetado se une específicamente a un antígeno expresado en la superficie de una célula diana.
- 35 Dicha partícula de vector retroviral o partícula similar a virus de la misma, en donde dicha partícula comprende una proteína de fusión (F) y una proteína hemaglutinina (H) del virus del sarampión o la cepa Edmonston del virus del sarampión, y/o en donde la porción citoplasmática truncada de la proteína F comprende al menos 3 residuos de aminoácidos consecutivos contados desde el extremo N-terminal de la porción citoplasmática de la proteína F y la porción citoplasmática truncada de la proteína H comprende al menos 13 residuos de aminoácidos consecutivos contados desde el extremo C-terminal de la porción citoplasmática de la proteína H más una metionina adicional en el extremo N-terminal, en donde de uno a cuatro de los residuos de aminoácidos N-terminales de dichos al menos 13 residuos de aminoácidos consecutivos contados desde el extremo C-terminal de la porción citoplasmática de la proteína H pueden reemplazarse por residuos de alanina, y/o en donde la partícula de vector retroviral pseudotipada o partícula similar a virus de la misma se deriva de un lentivirus seleccionado del grupo que consiste en VIH-1, VIH-2, SIVmac, SIVpbj, SIVagm, FIV y EIAV, y/o
- 40 Dicha partícula de vector retroviral o partícula similar a virus de la misma, en donde dicha partícula comprende una proteína de fusión (F) y una proteína hemaglutinina (H) del virus del sarampión o la cepa Edmonston del virus del sarampión, y/o en donde la porción citoplasmática truncada de la proteína F comprende al menos 3 residuos de aminoácidos consecutivos contados desde el extremo N-terminal de la porción citoplasmática de la proteína F y la porción citoplasmática truncada de la proteína H comprende al menos 13 residuos de aminoácidos consecutivos contados desde el extremo C-terminal de la porción citoplasmática de la proteína H más una metionina adicional en el extremo N-terminal, en donde de uno a cuatro de los residuos de aminoácidos N-terminales de dichos al menos 13 residuos de aminoácidos consecutivos contados desde el extremo C-terminal de la porción citoplasmática de la proteína H pueden reemplazarse por residuos de alanina, y/o en donde la partícula de vector retroviral pseudotipada o partícula similar a virus de la misma se deriva de un lentivirus seleccionado del grupo que consiste en VIH-1, VIH-2, SIVmac, SIVpbj, SIVagm, FIV y EIAV, y/o
- 45 Dicha partícula de vector retroviral o partícula similar a virus de la misma, en donde dicha partícula comprende una proteína de fusión (F) y una proteína hemaglutinina (H) del virus del sarampión o la cepa Edmonston del virus del sarampión, y/o en donde la porción citoplasmática truncada de la proteína F comprende al menos 3 residuos de aminoácidos consecutivos contados desde el extremo N-terminal de la porción citoplasmática de la proteína F y la porción citoplasmática truncada de la proteína H comprende al menos 13 residuos de aminoácidos consecutivos contados desde el extremo C-terminal de la porción citoplasmática de la proteína H más una metionina adicional en el extremo N-terminal, en donde de uno a cuatro de los residuos de aminoácidos N-terminales de dichos al menos 13 residuos de aminoácidos consecutivos contados desde el extremo C-terminal de la porción citoplasmática de la proteína H pueden reemplazarse por residuos de alanina, y/o en donde la partícula de vector retroviral pseudotipada o partícula similar a virus de la misma se deriva de un lentivirus seleccionado del grupo que consiste en VIH-1, VIH-2, SIVmac, SIVpbj, SIVagm, FIV y EIAV, y/o
- 50 Dicha partícula de vector retroviral o partícula similar a virus de la misma, en donde dicha partícula comprende una proteína de fusión (F) y una proteína hemaglutinina (H) del virus del sarampión o la cepa Edmonston del virus del sarampión, y/o en donde la porción citoplasmática truncada de la proteína F comprende al menos 3 residuos de aminoácidos consecutivos contados desde el extremo N-terminal de la porción citoplasmática de la proteína F y la porción citoplasmática truncada de la proteína H comprende al menos 13 residuos de aminoácidos consecutivos contados desde el extremo C-terminal de la porción citoplasmática de la proteína H más una metionina adicional en el extremo N-terminal, en donde de uno a cuatro de los residuos de aminoácidos N-terminales de dichos al menos 13 residuos de aminoácidos consecutivos contados desde el extremo C-terminal de la porción citoplasmática de la proteína H pueden reemplazarse por residuos de alanina, y/o en donde la partícula de vector retroviral pseudotipada o partícula similar a virus de la misma se deriva de un lentivirus seleccionado del grupo que consiste en VIH-1, VIH-2, SIVmac, SIVpbj, SIVagm, FIV y EIAV, y/o
- 55 Dicha partícula de vector retroviral o partícula similar a virus de la misma, en donde dicha partícula comprende una proteína de fusión (F) y una proteína hemaglutinina (H) del virus del sarampión o la cepa Edmonston del virus del sarampión, y/o en donde la porción citoplasmática truncada de la proteína F comprende al menos 3 residuos de aminoácidos consecutivos contados desde el extremo N-terminal de la porción citoplasmática de la proteína F y la porción citoplasmática truncada de la proteína H comprende al menos 13 residuos de aminoácidos consecutivos contados desde el extremo C-terminal de la porción citoplasmática de la proteína H más una metionina adicional en el extremo N-terminal, en donde de uno a cuatro de los residuos de aminoácidos N-terminales de dichos al menos 13 residuos de aminoácidos consecutivos contados desde el extremo C-terminal de la porción citoplasmática de la proteína H pueden reemplazarse por residuos de alanina, y/o en donde la partícula de vector retroviral pseudotipada o partícula similar a virus de la misma se deriva de un lentivirus seleccionado del grupo que consiste en VIH-1, VIH-2, SIVmac, SIVpbj, SIVagm, FIV y EIAV, y/o en donde la proteína F truncada es FcΔ24 o FcΔ30 y/o la proteína H truncada se selecciona del grupo que consiste en HcΔ14, HcΔ15, HcΔ16, HcΔ17, HcΔ18, HcΔ19, HcΔ20, HcΔ21+A y HcΔ24+4A.

Dicha composición de partícula de vector retroviral o partícula similar a virus y polipéptido etiquetado, en donde el polipéptido de dicho polipéptido etiquetado puede ser una proteína con restos de unión a antígeno al antígeno expresado en la célula diana tal como un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, citocinas o factores de crecimiento.

- 5 Dicho polipéptido de dicho polipéptido etiquetado puede ser un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a dicho antígeno expresado en la superficie de dicha célula diana, y en donde la etiqueta de dicho polipéptido etiquetado puede ser un hapteno.

Dicho hapteno puede seleccionarse del grupo que consiste en biotina, isocianato de fluoresceína (FITC), fluoresceína, NHS-fluoresceína, 2,4-dinitrofenol (DNP), digoxigenina y dextrano.

- 10 Dicho hapteno puede ser biotina.

Dicho polipéptido de dicho polipéptido etiquetado puede unirse a un antígeno expresado en la superficie de dicha célula diana, y en donde la unión de dicho polipéptido a dicho antígeno puede activar dicha célula diana.

Dicha etiqueta puede ser degradable catalíticamente.

- 15 Dicho polipéptido que comprende un dominio de unión a antígeno específico para una etiqueta de un polipéptido etiquetado, y en donde dicho dominio de unión a antígeno se deriva de un scFV derivado de un anticuerpo y en donde la secuencia de aminoácidos se ha mutado en la región marco de dicho scFV para mejorar la expresión de superficie y/o la estabilidad de dicho polipéptido.

- 20 Dicho polipéptido de dicho polipéptido etiquetado puede ser un resto de unión a antígeno (ABM), en donde la etiqueta de dicho polipéptido etiquetado es un epítipo de enlazador/etiqueta (LLE) de una molécula de unión a célula diana (TCBM) que comprende

i) un resto de unión a antígeno (ABM), en donde dicho ABM se une específicamente a dicho antígeno expresado en la superficie de dicha célula diana,

ii) un resto de etiqueta (LaM), en donde dicho LaM es una molécula de origen natural en un sujeto o un derivado de la misma,

- 25 iii) un resto de enlazador (LiM) que conjuga dicho ABM y dicho LaM, formando de ese modo un epítipo de enlazador/etiqueta (LLE),

en donde dicho dominio de unión a antígeno de dicho polipéptido específico para una etiqueta es el dominio de unión a epítipo de enlazador/etiqueta (LLE),

en donde dicho dominio de unión a LLE se une a dicho LLE con una preferencia mayor que

- 30 dicha molécula de origen natural.

Dicho dominio de unión a LLE puede unirse con una afinidad al menos dos veces, preferentemente al menos 5 veces, más preferentemente al menos 10 veces, más preferentemente al menos 50 veces mayor a dicho LLE que a dicha molécula de origen natural.

- 35 El valor de $k(\text{off})$ para la unión entre dicho dominio de unión a LLE puede ser superior a un LLE monomérico y dicha molécula de origen natural que a un LLE multimérico.

Dicha molécula de origen natural puede estar en el sistema circulatorio de dicho sujeto.

Dicho LLE puede generarse de manera específica de sitio, formando así un epítipo que comprende una parte de dicho LaM y una parte de dicho LiM.

- 40 Dicho LaM puede seleccionarse del grupo que consiste en aminoácidos, péptidos, proteínas, creatinina, biotina, biocitina, lípidos, hormonas, vitaminas, hidratos de carbono o un derivado de los mismos. Dicho LiM puede ser una molécula capaz de generar dicho LLE.

Dicho LiM puede seleccionarse del grupo que consiste en péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidratos de carbono, polihidroxialcanoatos, cadenas alquílicas, ácidos alcanoicos, ácidos carboxílicos, farnesilos, polietilenglicoles, lípidos o un derivado de los mismos.

- 45 Dicho LaM puede ser biotina o un derivado de la misma y dicho LiM puede ser un resto 6-(6-aminohexanamido)hexanoílo o un resto 6-aminohexanoílo.

Dicho dominio de unión a LLE puede comprender la secuencia de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, preferentemente el orden de la secuencia desde el extremo N al extremo C es VH-VL.

5 Dicho antígeno de dicho polipéptido etiquetado puede seleccionarse del grupo que consiste en TCR, CD3, CD4, CD8, CD25, CD62L, CD69, CD137, CD44, CD45RA, CD45RO, CD137, CD152, CD154, CCR5, CCR7, PD-1, CTLA-4, CD105, NKR-P1A, CD56, NCAM-1, CD57, CD14, CD16, CD19, CD20, CD30, CD34, CD133, CD38, BDCA-1, BDCA-2, BDCA-3, GM-CSF, CD11b, A2B5, ACSA-2, GLAST, AN2, CX3CR1, O4, CD15, CD11, CD144, SSEA-4, TRA-1 CD33 (Siglec-3), CD123, (IL3RA), CD135 (FLT-3), CD44 (HCAM), CD44V6, CD47, CD184 (CXCR4) CLEC12A (CLL1), LeY, FRβ, MICA/B, CD305 (LAIR-1), CD366 (TIM-3), CD96 (TACTILE), CD29 (ITGB1), CD47 (IAP), CD66 (CEA), CD112 (Nectin2), CD117 (c-Kit), CD146 (MCAM), CD155 (PVR), CD171 (LICAM), CD221 (IGF1), CD227 (MUC1), CD243 (MRD1), CD246 (ALK), CD271 (LNGFR), GD2 y EGFR.

Dicho ABM puede ser un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

10 Dicha célula diana puede seleccionarse del grupo que consiste en células inmunitarias, células hematopoyéticas, células madre, células musculares, células cancerosas, células del sistema nervioso, células progenitoras endoteliales (EPC), células endoteliales y células enfermas.

Cualquiera de las variantes y realizaciones divulgadas anteriormente de la combinación de partículas de vector retroviral o partículas similares a virus de las mismas y polipéptidos etiquetados pueden combinarse entre sí.

15 En un aspecto adicional, la presente divulgación, pero sin formar parte de la invención, proporciona una partícula de vector retroviral pseudotipada o partícula similar a virus de la misma que comprende:

a) una proteína de la envuelta con actividad de unión a antígeno, en donde dicha proteína de la envuelta es una proteína recombinante que no interactúa con al menos uno de su(s) receptor(es) nativo(s) y está fusionada en su ectodominio a un polipéptido que comprende un dominio de unión a antígeno específico para una etiqueta de un polipéptido etiquetado, y en donde dicha proteína de la envuelta es la proteína G, HN o H derivada de la familia Paramyxoviridae.

20

b) una proteína de la envuelta con actividad de fusión derivada de la familia Paramyxoviridae; y en donde dicho polipéptido etiquetado se une específicamente a un antígeno expresado en la superficie de una célula diana, transduciendo de ese modo la célula diana con dicha partícula de vector retroviral o induciendo de ese modo la captación de la partícula similar a virus en la célula diana.

25

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende las composiciones como se divulga en el presente documento, es decir, la partícula de vector retroviral pseudotipada o partícula similar a virus de la misma como se divulga en el presente documento y el polipéptido etiquetado como se divulga en el presente documento, que opcionalmente comprende además un portador farmacéuticamente aceptable.

30 En un aspecto adicional, la presente divulgación, pero sin formar parte de la invención, proporciona una composición de la partícula de vector retroviral pseudotipada o partícula similar a virus de la misma y el polipéptido etiquetado como se divulga en el presente documento para su uso como medicamento.

En otro aspecto, la presente divulgación, pero sin formar parte de la invención, proporciona el uso de la composición de la partícula de vector retroviral pseudotipada o partícula similar a virus de la misma y el polipéptido etiquetado como se divulga en el presente documento para la preparación de un medicamento.

35

En un aspecto adicional, la presente divulgación, pero sin formar parte de la invención, proporciona un método para producir una partícula de vector retroviral pseudotipada o partícula similar a virus de la misma, comprendiendo el método:

cotransfección de una línea celular de empaquetamiento con al menos un vector de expresión psi-negativo que codifica los genes retrovirales *gag/pol/rev*, un vector de expresión retroviral psi-positivo y uno o dos vectores de expresión psi-negativos que codifican proteínas de la envuelta del virus Paramyxoviridae como se divulga en el presente documento.

40

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método *in vitro* para transducir células diana con una partícula de vector retroviral pseudotipada o la administración de las proteínas de la partícula similar a virus de la misma que comprende las etapas

a) preincubación de células diana con un polipéptido etiquetado, y

45 b) adición de dicha partícula de vector retroviral o partículas similares a vectores de la misma a las células diana preincubadas de la etapa a),

en donde dicho polipéptido etiquetado se une específicamente a un antígeno expresado en la superficie de una célula diana, transduciendo de ese modo la célula diana con dicha partícula de vector retroviral o induciendo de ese modo la captación de la partícula similar a virus en la célula diana, y

50

en donde dicha partícula de vector retroviral pseudotipada o partícula similar a virus de la misma comprende:

I) una proteína de la envuelta con actividad de unión a antígeno, en donde dicha proteína de la envuelta es una proteína recombinante que no interactúa con al menos uno de sus receptores nativos y está fusionada en su ectodominio a un polipéptido que comprende un dominio de unión a antígeno específico para una etiqueta de dicho polipéptido etiquetado, y en donde dicha proteína de la envuelta es la proteína H de un virus de la familia Paramyxoviridae, en donde dicha proteína H de un virus de la familia Paramyxoviridae carece de al menos una parte de la región citoplasmática de dicha proteína H,

II) una proteína de la envuelta con actividad de fusión de un virus de la familia Paramyxoviridae, en donde dicha proteína de la envuelta con actividad de fusión carece de al menos una parte de la región citoplasmática de dicha proteína de la envuelta,

y en donde dicho virus Paramyxoviridae es un virus del género morbillivirus, y en donde dicha partícula de vector retroviral es una partícula de vector lentiviral o gammaretroviral, o en donde dicha partícula de vector retroviral pseudotipada o partícula similar a virus de la misma comprende:

i) una proteína de la envuelta con actividad de unión a antígeno, en donde dicha proteína de la envuelta es una proteína recombinante que no interactúa con al menos uno de sus receptores nativos y está fusionada en su ectodominio a un polipéptido que comprende un dominio de unión a antígeno específico para una etiqueta de dicho polipéptido etiquetado, y en donde dicha proteína de la envuelta es la proteína G de un virus de la familia Paramyxoviridae, en donde dicha proteína G de un virus de la familia Paramyxoviridae carece de al menos una parte de la región citoplasmática de dicha proteína G,

ii) una proteína de la envuelta con actividad de fusión de un virus de la familia Paramyxoviridae, en donde dicha proteína de la envuelta con actividad de fusión carece de al menos una parte de la región citoplasmática de dicha proteína de la envuelta,

y en donde dicho virus Paramyxoviridae es un virus del género Henipavirus, y en donde dicha partícula de vector retroviral es una partícula de vector lentiviral o gammaretroviral.

Sorprendentemente, se encontró que el orden de adición del polipéptido etiquetado, las células diana y el vector retroviral del método divulgado en el presente documento influye fuertemente en la eficacia de la transducción (véase la FIG 5).

Dicho método, en donde, en la etapa b), puede usarse adicionalmente un potenciador de la transducción.

Dicho método, en donde dicho potenciador puede ser el péptido LAH4 que tiene la secuencia representada en SEQ ID NO: 15 ("Vectofusin-1[®]) o un derivado funcional del mismo que tiene la capacidad de mejorar la eficiencia de transducción o la captación de un vector retroviral o partícula similar a virus en la célula diana.

En un aspecto adicional, la presente divulgación, pero sin formar parte de la invención, proporciona un método *in vivo* para transducir una célula hematopoyética, preferiblemente una célula del subconjunto inmunitario o una célula madre, que comprende

a) administrar una formulación de polipéptidos etiquetados como se divulga en el presente documento a un sujeto que necesita tratamiento, en donde dichos polipéptidos etiquetados se unen a una célula diana, en donde dicha célula diana es una célula hematopoyética, preferentemente una célula del subconjunto inmunitario tal como una célula T o una célula NK, una célula NKT, una célula B, un macrófago, una célula dendrítica o una célula madre capaz de dar lugar a dicha célula del subconjunto inmunitario,

b) administrar al sujeto una formulación de partículas de vector de retrovirus pseudotipadas o partículas similares a virus de las mismas como se divulga en el presente documento, en donde dichas partículas de vector de retrovirus pseudotipadas o partículas similares a virus de las mismas se unen a los polipéptidos etiquetados, transduciendo de ese modo la célula diana con dicha partícula de vector retroviral o induciendo de ese modo la captación de la partícula similar a virus en la célula diana.

Dicho método, en donde dichas partículas de vector de retrovirus pseudotipados o partículas similares a virus portan al menos un transgén, transduciendo de ese modo dicho transgén en la célula diana, y permitiendo de ese modo la inmunoterapia del sujeto por las células transducidas después de la expresión de dicho transgén en las células diana.

Dicho método, en donde dicho transgén es un gen que codifica, por ejemplo, un receptor de antígeno quimérico.

En otro aspecto, la presente divulgación, pero sin formar parte de la invención, proporciona un método *in vivo* para transducir una célula madre defectuosa, que comprende

a) administrar una formulación de polipéptidos etiquetados como se divulga en el presente documento a un sujeto que necesita tratamiento, en donde dichos polipéptidos etiquetados se unen a una célula diana, en donde dicha célula diana es una célula madre defectuosa,

5 b) administrar al sujeto una formulación de partículas de vector de retrovirus pseudotipadas o partículas similares a virus de las mismas como se divulga en el presente documento, en donde dichas partículas de vector de retrovirus pseudotipadas o partículas similares a virus de las mismas se unen a los polipéptidos etiquetados, transduciendo de ese modo la célula diana con dicha partícula de vector retroviral o induciendo de ese modo la captación de la partícula similar a virus en la célula diana.

Dicho método, en donde dichas partículas de vector de retrovirus pseudotipadas o partículas similares a virus portan al menos un transgén, transduciendo de ese modo dicho transgén en la célula diana.

10 Dicho método, en donde dicho transgén codifica un alelo no mutado de una enfermedad monogénica tal como Beta-talasemia, síndrome de Wiskott-Aldrich, corrigiendo de ese modo la célula madre defectuosa para que sea una célula madre no defectuosa.

15 Todas las definiciones, características y realizaciones definidas en el presente documento con respecto al primer aspecto de la invención, la composición que comprende la partícula de vector retroviral pseudotipada o partícula similar a virus de la misma como se divulga en el presente documento y el polipéptido etiquetado como se divulga en el presente documento, también se aplican cambiando lo que se tenga que cambiar en el contexto de los otros aspectos de la invención como se divulga en el presente documento.

Realizaciones

Además de las aplicaciones descritas anteriormente del sistema de partículas de vector retroviral adaptable como se divulga en el presente documento o del sistema de partículas similares a virus como se divulga en el presente documento, a continuación se describen realizaciones adicionales de la divulgación, pero que no forman parte de la invención.

20 En una realización preferida del sistema de vector retroviral adaptable, las células diana presentes en una población celular mixta con células no diana se transducen selectivamente o se induce selectivamente la captación de VLP.

En otra realización del sistema de vector retroviral adaptable, la especificidad del polipéptido etiquetado se ajusta según el nivel de expresión de un antígeno en las células diana.

25 Por ejemplo, las células o los tipos de células que no expresan niveles suficientes de receptores de VSV-G y, por lo tanto, son resistentes a la transducción del vector retroviral pseudotipado VSV-G, pueden transducirse de manera más eficiente usando el sistema de vector retroviral adaptable y polipéptidos etiquetados específicos para antígenos de receptores que se expresan a niveles más altos en comparación con los niveles de expresión del receptor de VSV-G.

En otra realización del sistema de vector retroviral adaptable, la activación de las células diana se induce tras la unión de la partícula de vector retroviral o del complejo de partículas similares a virus al antígeno diana.

30 En otra realización del sistema de vector retroviral adaptable, las poblaciones de células diana que expresan diferentes antígenos pueden transducirse simultánea o posteriormente combinando polipéptidos etiquetados con diferentes especificidades.

35 En otra realización del sistema de vector retroviral adaptable, las células diana que se caracterizan por múltiples antígenos se transducen selectivamente o han captado VLP selectivamente si se requieren polipéptidos etiquetados específicos para todos los antígenos para inducir la transducción selectiva o la captación de VLP.

40 En otra realización del sistema de vector retroviral adaptable, la eficiencia de transducción o la captación de VLP se reduce liberando el vector retroviral del polipéptido etiquetado mediante la adición de un polipéptido o ligando alternativo, en donde dicho polipéptido o ligando alternativo se une con una afinidad preferiblemente mayor a una etiqueta en un adaptador etiquetado en comparación con el polipéptido específico para la etiqueta que está fusionado al ectodominio de dicha proteína de la envuelta de dicho vector retroviral o partícula similar a virus del mismo.

Por ejemplo: la adición de avidina, un ligando de biotina, a un vector retroviral específico de etiqueta unido al polipéptido etiquetado puede reducir o inhibir esta unión y se reduce la transducción o la captación de VLP.

En otra realización del sistema de vector retroviral adaptable, la eficiencia de transducción o la captación de VLP se reduce eliminando o degradando dicha etiqueta de dicho polipéptido etiquetado.

45 En otra realización del sistema de vector retroviral adaptable, la eficiencia de transducción o la captación de VLP se reduce eliminando o degradando dicho polipéptido etiquetado.

50 En otra realización del sistema de vector retroviral adaptable, la eficiencia de transducción o la captación de VLP se reduce añadiendo una etiqueta alternativa, en donde dicho vector retroviral o partícula viral del mismo se une preferiblemente con mayor afinidad a la etiqueta alternativa y el vector retroviral o partícula similar a virus del mismo ya no se une al polipéptido etiquetado.

En otra realización del sistema de vector retroviral adaptable, la eficiencia de transducción o la captación de VLP se reduce añadiendo moléculas de etiqueta en exceso, en donde dicho vector retroviral o partícula de virus del mismo se une preferentemente a la etiqueta añadida.

5 En otra realización del sistema de vector retroviral adaptable, la eficiencia de transducción o la captación de VLP se reduce añadiendo un polipéptido etiquetado alternativo, en donde dicho adaptador alternativo es específico para el mismo antígeno pero se une con mayor afinidad a dicho antígeno expresado en dicha célula diana.

En otra realización del sistema de vector retroviral adaptable, la eficiencia de transducción o la captación de VLP se reduce eliminando o degradando dicho polipéptido que está fusionado al ectodominio de dicha proteína de la envuelta con actividad de unión a antígeno.

10 En otra realización del sistema de vector retroviral adaptable, la eficiencia de transducción o la captación de VLP se controla modificando la afinidad y/o avidéz de dicho polipéptido etiquetado hacia dicho antígeno expresado en dicha célula diana.

En otra realización del sistema de vector retroviral adaptable, la eficiencia de transducción o la captación de VLP se controla variando la cantidad de dicho polipéptido etiquetado.

15 En otra realización del sistema de vector retroviral adaptable, la transducción selectiva o captación de VLP tiene lugar *in vivo*.

En otra realización del sistema de vector retroviral adaptable, la transducción selectiva o captación de VLP tiene lugar *in vitro* o *in vivo* y se usa para examinar e identificar antígenos a los que se une dicho polipéptido etiquetado.

20 En otra realización del sistema de vector retroviral adaptable, la transducción selectiva o captación de VLP tiene lugar *in vitro* o *in vivo* y se usa para examinar e identificar antígenos y/o células diana a los que se une dicho polipéptido etiquetado.

En otra realización del sistema de vector retroviral adaptable, la transducción selectiva o captación de VLP tiene lugar *in vitro* o *in vivo* y se usa para examinar e identificar polipéptidos que se unen a antígenos diana expresados en células diana.

25 En otra realización del sistema de vector retroviral adaptable, el vector retroviral o VLP del mismo suministra un gen de interés para generar una célula o un animal recombinante.

En otra realización del sistema de vector retroviral adaptable, el vector retroviral o VLP del mismo suministra un gen de interés que codifica una proteína terapéutica para tratar o prevenir una enfermedad. En otra realización del sistema de vector retroviral adaptable, el vector retroviral o VLP del mismo suministra una proteína de interés que puede usarse con fines de vacunación o edición de genes con, por ejemplo, Crispr/Cas.

30 En otra realización del sistema de vector retroviral adaptable, el vector retroviral es de integración deficiente.

Definiciones

A menos que se defina lo contrario, los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente una persona con conocimientos ordinarios en la técnica a la que pertenece esta invención.

35 Retroviridae es una familia de virus con un genoma de ARN monocatenario, diploide y de sentido positivo que se transcribe de forma inversa en un intermedio de ADN que luego se incorpora al genoma de la célula huésped. Los virus derivados de Retroviridae son partículas envueltas con un diámetro de 80 a 120 nm.

40 Los vectores (retro-/lenti-/gammaretro-) virales son partículas virales de replicación deficiente que se derivan de la familia de virus correspondiente. Contienen proteínas Gag y Pol, un genoma de ARN monocatenario y habitualmente se pseudotipan con proteínas de la envuelta heterólogas derivadas de otros virus. El genoma de ARN de dichos vectores virales no contiene ningún gen viral para producir progenie viral, sino elementos psi y LTR que se requieren para un eficiente empaquetamiento y transcripción inversa en ADN. El intermedio de ADN puede contener un gen de interés bajo el control de un promotor adecuado, por ejemplo, el promotor de CMV y el gen de interés se expresa tras la integración de dicho ADN en el genoma de la célula huésped. El proceso de entrada en la célula huésped, suministro del genoma de ARN, integración y expresión del gen de interés se denomina transducción. Los requisitos mínimos de un vector viral basado en gammaretrovirus o lentivirus se han descrito bien en la técnica.

45 Además, se han desarrollado vectores retrovirales deficientes en integrasa (ID-RV) que no pueden integrar el genoma del vector retroviral en el genoma de la célula huésped. Los ID-RV se derivan de vectores retrovirales convencionales, pero no contienen o contienen una forma mutada de la integrasa retroviral. Al ingresar a la célula huésped, el genoma del vector retroviral se transcribe de manera inversa en el citoplasma y se distribuye al núcleo, pero no se integra de manera estable en el genoma de la célula huésped. Los ID-RV son herramientas útiles para expresar el gen de interés de manera transitoria. La definición de vectores retrovirales y la transducción también amplían los vectores retrovirales de integración deficiente y su aplicación.

Lentivirus es un género de Retroviridae que causan enfermedades crónicas y mortales caracterizadas por largos períodos de incubación en seres humanos y en otras especies de mamíferos. El lentivirus mejor conocido es el virus de inmunodeficiencia humana VIH, que puede infectar eficazmente células que no se dividen, por lo que los vectores retrovirales derivados de lentivirus son uno de los métodos más eficientes de administración de genes. Gammaretroviridae es un género de la familia Retroviridae. Las especies representativas son el virus de la leucemia murina y el virus de la leucemia felina.

Paramyxoviridae es una familia de virus del orden Mononegavirales. Actualmente, hay 49 especies en esta familia, divididas en 7 géneros. Las enfermedades asociadas con esta familia de virus incluyen sarampión, paperas e infecciones del tracto respiratorio. Los miembros de esta familia de virus son virus envueltos con un genoma de ARN de cadena negativa no segmentado de aproximadamente 16 kb. Dos proteínas de membrana con dos funciones distintas aparecen como espigas en la superficie del virión. Las proteínas H/HN/G median en la unión al receptor en la superficie celular.

Por lo tanto, el término "proteína(s) de la envuelta del virus que tiene(n) actividad de unión a antígenos" como se usa en el presente documento se refiere a proteína(s) de la envuelta del virus que son responsables de la unión a receptores o antígenos complementarios en la membrana celular de una célula diana. Para Paramyxoviridae, las proteínas H, HN o G son proteína(s) de la envuelta del virus que tiene(n) actividad de unión a antígeno.

Al unirse, las proteínas H/HN/G cambian su conformación, lo que induce un proceso denominado función auxiliar de fusión, que conduce a cambios conformacionales posteriores dentro de la proteína F que media en la fusión de la membrana viral y celular. La cápside y el genoma viral pueden ahora entrar e infectar o transducir la célula huésped. El término "proteína(s) de la envuelta del virus que tiene(n) actividad de fusión" como se usa en el presente documento se refiere a proteína(s) que inicia(n) la fusión de la membrana viral y celular. Para Paramyxoviridae, las proteínas F se refieren a proteína(s) de la envuelta del virus que tiene(n) actividad de fusión.

Las partículas similares a virus (VLP) se parecen a las partículas virales, pero no infectan ni transducen porque no contienen material genético viral que codifique las proteínas de la partícula similar a virus. En particular, las VLP, en el contexto de vectores retrovirales, no contienen moléculas de ácido nucleico psi positivas. Algunas partículas similares a virus pueden contener ácido nucleico distinto de su genoma. La expresión de proteínas estructurales virales, como la envuelta o la cápside, puede dar como resultado el ensamblaje de partículas similares a virus (VLP). Al igual que en el caso de los vectores retrovirales, las VLP también pueden pseudotiparse usando los mismos constructos de la envuelta que en el caso de los vectores retrovirales. Las VLP pueden usarse para administrar proteínas, pero también ácidos nucleicos, al citoplasma de las células diana. En particular, las VLP son útiles como vacunas. El término "captación de VLP", como se usa en el presente documento, se refiere a la unión de una VLP a la membrana de la célula diana, liberando así moléculas de ácido nucleico, proteínas o péptidos en la célula diana. Las proteínas quiméricas son proteínas creadas mediante la unión de dos o más genes que originalmente codificaban proteínas separadas. La traducción de este gen da como resultado uno o varios polipéptidos con propiedades funcionales derivadas de cada una de las proteínas originales. Las proteínas recombinantes se crean artificialmente mediante tecnología de ADN recombinante para su uso en investigación biológica o terapéutica.

El término "ectodominio" como se usa en el presente documento se refiere a un dominio de una proteína de membrana que se extiende hacia el espacio extracelular (el espacio fuera de una célula).

El término "activación" como se usa en el presente documento se refiere a inducir cambios fisiológicos en una célula que aumentan la función, proliferación y/o diferenciación de la célula diana.

El término "pseudotipar" o "pseudotipado" tal como se usa en el presente documento se refiere a una partícula de vector que lleva glicoproteínas de la envuelta derivadas de otros virus que tienen envueltas. La gama de hospedadores de los vectores lentivirales o partículas de vector de la presente invención puede, por tanto, ampliarse o alterarse dependiendo del tipo de receptor de superficie celular utilizado por la glicoproteína.

Para generar vectores retrovirales, las proteínas gag, pol y env necesarias para ensamblar la partícula de vector se proporcionan en trans por medio de una línea celular de empaquetamiento, por ejemplo, HEK-293T. Esto se logra habitualmente mediante la transfección de la línea celular de empaquetamiento con uno o más plásmidos que contienen los genes *gag*, *pol* y *env*. Para la generación de vectores pseudotipados, el gen *env*, originalmente derivado del mismo retrovirus que los genes *gag* y *pol* y como la molécula de ARN o el vector de expresión, se intercambia por la(s) proteína(s) de la envuelta de un virus con una envuelta diferente. Como ejemplo, se usa la proteína F y H o HN o G de Paramyxoviridae. Por lo tanto, una partícula de vector pseudotipada a modo de ejemplo basada en el retrovirus VIH-1 comprende (1) las proteínas Gag y Pol de VIH-1, (2) una molécula de ARN derivada del genoma de VIH-1 que puede usarse para generar una partícula de vector retroviral basada en el genoma de VIH-1 que carece de los genes *gag*, *env*, *pol*, *tat*, *vif*, *vpr*, *vpu* y *nef*, pero que aún comprende las LTR, el elemento psi y un promotor de CMV seguido del gen que va a transducirse, por ejemplo, un gen para la proteína GFP, y (3) las proteínas F y H del virus del sarampión, por ejemplo, en forma truncada.

El término "receptor nativo" tal como se usa en el presente documento se refiere al receptor o antígeno expresado en la superficie celular de una célula al que se une la proteína de la envuelta del virus de origen natural con actividad de unión a antígeno (receptor). Los receptores nativos del virus del sarampión son SLAM, nectina-4 y CD46. Las proteínas de la

envuelta del virus Nipah usan efrina-B2 y efrina-B3 como receptores para su entrada.

El término "una proteína de la envuelta con actividad de unión a antígeno que no interactúa con al menos uno de sus receptores nativos" como se usa en el presente documento significa que dicha proteína tiene una interacción reducida o suprimida con al menos un receptor de una célula que normalmente es el objetivo del virus que tiene dicha proteína como se describe en otra parte del presente documento. Una interacción reducida significa que dicha proteína troncada y/o mutada interactúa con dicho al menos un receptor nativo al menos un 50 % menos eficientemente, al menos un 60 % menos eficientemente, al menos un 70 % menos eficientemente, al menos un 80 % menos eficientemente, al menos un 90 % menos eficientemente, al menos un 95 % menos eficientemente, al menos un 99 % menos eficientemente en comparación con la proteína no mutada. Preferentemente, dicha proteína ya no interactúa con dicho al menos uno de sus receptores nativos. La interacción puede ser la unión de estas dos moléculas entre sí. La interacción menos eficiente puede ser una afinidad reducida de dicha proteína a su receptor nativo. Dicha proteína de la envuelta con actividad de unión a antígeno puede tener más de un receptor nativo, en cuyo caso la reducción o supresión de la interacción de uno de estos receptores nativos de dicha proteína da como resultado un tropismo reducido de la partícula de vector o partícula similar a virus de la misma. Cuantas más interacciones de dicha proteína con sus receptores nativos se inhiban por mutación, más eficaz será la reducción del tropismo de la partícula de vector o partícula similar a virus de la misma.

En algunos casos, puede ser suficiente inhibir la interacción de algunos pero no todos los receptores nativos con dicha proteína ya que las interacciones restantes no son relevantes en la aplicación o uso previsto de la partícula de vector retroviral o partícula similar a virus de la misma como se divulga en el presente documento, por ejemplo, cuando un receptor nativo no se expresa en ninguna célula (células diana y células no diana) en el entorno de las células diana que se pretende transducir.

Si una proteína de la envuelta con actividad de unión a antígeno tiene más de 2 receptores nativos, por ejemplo 3 receptores nativos, entonces, preferentemente, dicha proteína no interactúa con la mayoría de los receptores nativos, por ejemplo 2 de 3.

De manera más preferente, la proteína de la envuelta con actividad de unión a antígeno no interactúa con todos sus receptores nativos.

El término "tropismo", como se usa en el presente documento, se refiere al rango de hospedadores o la especificidad de un virus, un vector retroviral o una partícula similar a virus del mismo. Como se usa en el presente documento, el polipéptido etiquetado específico para el antígeno expresado en las células diana define el rango de hospedadores del vector retroviral o partícula similar a virus del mismo.

El término "no trópico humano" como se usa en el presente documento se refiere a la incapacidad de un virus, un vector retroviral o una partícula similar a virus del mismo para infectar, transducir o inducir la captación de VLP debido a que la(s) proteína(s) de la envuelta del virus que tiene(n) actividad de unión a antígeno se han mutado para reducir, preferentemente suprimir, la unión a cualquier antígeno expresado en células humanas.

El término "célula diana" como se usa en el presente documento se refiere a una célula que expresa un antígeno (un marcador) en su superficie celular que debe reconocer (unir) el polipéptido etiquetado del sistema adaptable como se divulga en el presente documento. La célula diana puede ser una célula primaria eucariota o una línea celular. La célula diana puede ser una célula de mamífero, tal como una célula murina, preferentemente la célula diana es una célula humana.

El término "células no diana" como se usa en el presente documento se refiere a una célula que no expresa el antígeno (un marcador) en su superficie celular que debe reconocer (unir) el polipéptido etiquetado del sistema adaptable como se divulga en el presente documento.

El término "selectivo" y "dirigido" como se usa en el presente documento se refiere a partículas de vector retroviral o partículas similares a virus de las mismas que inducen una transducción o captación de partículas similares a virus preferente en células diana. Por lo tanto, la transducción de partículas de vector retroviral pseudotipadas o la captación inducida de partículas similares a virus pseudotipadas de las mismas es 10 veces mayor, preferentemente 100 veces mayor, lo más preferentemente 1000 veces mayor en dichas células diana que en células no diana. En la presente invención, esto se logra incubando células con un polipéptido etiquetado en presencia de un vector retroviral pseudotipado o partículas similares a virus del mismo que comprende una proteína de la envuelta con actividad de unión a antígeno con interacción reducida o suprimida con su(s) receptor(es) nativo(s) y un polipéptido de fusión que comprende un dominio de unión a antígeno específico para una etiqueta de un polipéptido etiquetado en el ectodominio de dicha proteína de la envuelta. Para Paramyxoviridae, las proteínas H/HN y G son proteínas con actividad de unión a antígeno.

Por lo tanto, el tropismo de una partícula de vector retroviral selectiva o dirigida o partícula similar a virus de la misma de la presente invención no está definido por el tropismo del virus del que se deriva la proteína H, sino que depende de la especificidad del polipéptido etiquetado por un antígeno de superficie celular de una célula diana. Como se usa en el presente documento, el polipéptido con un dominio de unión a antígeno específico para la etiqueta del polipéptido etiquetado fusionado con la proteína de la envuelta con actividad de unión a antígeno tiene una interacción reducida o suprimida con cualquier antígeno expresado en la superficie celular. Para vectores retrovirales selectivos o partículas similares a virus de los mismos pseudotipados con proteínas de la envuelta del virus del sarampión, la proteína H troncada

fusionada al polipéptido que comprende un dominio de unión a antígeno específico para una etiqueta de un polipéptido etiquetado como se describe en el presente documento debe tener mutaciones que generalmente reducen o suprimen las interacciones productivas con sus receptores nativos. Tales mutaciones se conocen bien en la técnica. Una mutación que suprime la interacción de la proteína H del sarampión con CD46 es, por ejemplo, la mutación puntual en la posición Y481, F431, V451, Y452, A527, P486, I487, A428, L464, G546, S548, F549, en donde estos aminoácidos se sustituyen por otro aminoácido y esta mutación impide o ayuda a impedir la interacción de la proteína H con CD46. Alternativamente, la sustitución de los cinco residuos consecutivos 473 a 477 en la proteína H por alanina puede impedir la interacción de la proteína H con CD46. Cualquiera de las mutaciones citadas anteriormente pueden combinarse entre sí.

Por ejemplo, la siguiente introducción de mutaciones suprime la interacción productiva de la proteína H del sarampión con CD46 y SLAM, respectivamente: Y481A R533A. (Nakamura *et al.* (2004), Nakamura *et al.* (2005), Vongpunsawad *et al.* (2004), Masse *et al.* (2002), Masse *et al.* (2004), Patterson *et al.* (1999)). En otra realización, la proteína Hmut también incluye las mutaciones S548L y F549S, que conducen a una supresión más completa de la infectividad residual por medio de CD46. Además, la mutación de los residuos V451 e Y529 suprime la interacción productiva con CD46 y SLAM. Se han descrito anteriormente mutaciones alternativas para suprimir/prevenir la interacción de la proteína H con CD46. Todas estas mutaciones, que se introducen en las proteínas H truncadas para reducir o suprimir el uso natural del receptor, se encuentran en el ectodominio de la proteína H del sarampión. Para evitar la interacción de la proteína H con SLAM, uno de los siguientes residuos puede sustituirse por cualquier otro aminoácido, en particular, alanina: I194, D530, Y553, T531, P554, F552, D505, D507.

En el caso de la nectina-4, se han propuesto mutaciones que también anulan la unión a este receptor. Por ejemplo, Tahara *et al.* muestran que las sustituciones de aminoácidos F483A, Y541S e Y543S de la proteína H del virus del sarampión wt dan como resultado una actividad de fusión suprimida en células positivas para Nectin-4 (Tahara *et al.* (2008)). Esto ha sido confirmado por Liu *et al.*, que muestran que las sustituciones de aminoácidos F543A y P497S de H de la cepa Edmonston suprimen la infección por el virus de la estomatitis vesicular pseudotipado con las proteínas de la envuelta F y H de la cepa Edmonston (Liu *et al.* (2014)). Hay más residuos en la superficie de la molécula II que están bien conservados entre diferentes morbillivirus que pueden estar implicados en la fusión dependiente de Nectin-4, por ejemplo, Phe483, Asp521, Leu522, Tyr524, Tyr541, Tyr543, Ser544, Arg547, Ser550 y Tyr551 (Tahara *et al.* (2008)). Esto sugiere que otras mutaciones podrían ser útiles para prevenir la interacción con Nectin-4. Las partículas de vector lentiviral o gammaretroviral o partículas similares a virus de las mismas pseudotipadas con proteínas F truncadas y proteínas H mutadas que muestran además en su ectodominio un polipéptido que comprende un dominio de unión a antígeno específico para una etiqueta de un polipéptido etiquetado, en donde dicho polipéptido etiquetado es específico para un marcador de superficie celular de una célula diana, ya no ingresan en las células por medio de CD46, SLAM y/o nectina-4, sino que se dirigen y entran solo en aquellas células que muestran los respectivos marcadores correspondientes en su superficie por medio del dominio anti-etiqueta del polipéptido que comprende un dominio de unión a antígeno específico para una etiqueta fusionada a la proteína H truncada y el polipéptido etiquetado.

Para vectores retrovirales selectivos o partículas similares a virus de los mismos seudotipados con proteínas de la envuelta de Nipah, se requieren interacciones reducidas o suprimidas de la proteína G con los receptores nativos efrina-B2 y efrina-B3. Se identificaron residuos dentro de la proteína G mediante el cribado de mutantes que dieron como resultado variantes con capacidad de unión al receptor suprimida (Bender *et al.* (2016)). E501, W504, Q530, E533 se mutaron individualmente o en combinación. La mutación combinada de E501A, W504A, Q530A, E533A mostró una capacidad de unión al receptor completamente suprimida para ambos receptores efrina-B2 y efrina-B3.

Una partícula de vector retroviral pseudotipada o partícula similar a virus de la misma "derivada de", por ejemplo, VIH-1, como se usa en la presente invención, se refiere a una partícula en la que la información genética para el ARN y/o las proteínas Gag y Pol comprendidas por la partícula de vector proviene originalmente de dicho retrovirus, en el caso anterior, VIH-1. El genoma retroviral original puede comprender mutaciones, tales como deleciones, mutaciones por desplazamiento del marco de lectura e inserciones.

El término "porción citoplasmática", "cola citoplasmática" o "región citoplasmática", como se usa en el presente documento, se refiere a la porción de la proteína respectiva que se encuentra adyacente al dominio transmembrana de la proteína y, si la proteína se inserta en la membrana en condiciones fisiológicas, se extiende hasta el citoplasma. Dentro de Paramyxoviridae, todas las proteínas de la envuelta con función de unión a antígeno se caracterizan hasta la fecha como proteínas de membrana de tipo II, lo que significa que el dominio citoplasmático se encuentra en el extremo N-terminal de la proteína de la envuelta.

En el caso de la proteína F del sarampión, el dominio transmembrana se identifica mediante una secuencia de cinco aminoácidos (SEQ ID NO: 3), y en el caso de la proteína H del sarampión, el dominio se identifica mediante una secuencia de cuatro aminoácidos (SEQ ID NO: 4). La porción citoplasmática de la proteína F del sarampión consiste habitualmente en 33 aminoácidos C-terminales; la secuencia de la cepa Edmonston del sarampión puede encontrarse en la SEQ ID NO: 5. La porción citoplasmática de la proteína H del sarampión consiste normalmente en 34 aminoácidos N-terminales; la secuencia de la cepa Edmonston del sarampión puede encontrarse en la SEQ ID NO: 6.

Para la proteína G de Nipah, el dominio transmembrana se identifica habitualmente por la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 7 y la porción citoplasmática como se muestra en SEQ ID NO: 8.

Para la proteína F de Nipah, el dominio transmembrana se define habitualmente por la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 9 y la porción citoplasmática consiste habitualmente en la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 10.

5 El término "truncado", como se usa en la presente invención, se refiere a una delección de residuos de aminoácidos de la proteína designada. Es evidente para el experto en la técnica que una proteína está codificada por un ácido nucleico. Por lo tanto, "truncado" también se refiere a los ácidos nucleicos codificantes correspondientes en una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína "truncada" dada.

Además, debe entenderse que las moléculas de ácido nucleico que codifican una proteína truncada o modificada específica también están abarcadas, y viceversa.

10 En la presente invención, se hace referencia específica a las proteínas "H truncada", "G truncada" o "F truncada", que designa a los Paramyxoviridae, preferiblemente la proteína H del sarampión, la proteína G de Nipah y las proteínas F de Nipah o sarampión, respectivamente, cuya porción citoplasmática se ha truncado parcial o completamente, es decir, se han delecionado residuos de aminoácidos (o ácidos nucleicos codificantes de la molécula de ácido nucleico correspondiente que codifica la proteína).

15 La porción citoplasmática de la proteína F se encuentra en el extremo C de la proteína.

En el caso de todas las proteínas de la envuelta con la porción citoplasmática ubicada en el extremo C-terminal, se comienza a contar desde el extremo C-terminal de la proteína para determinar la secuencia deseada. Por ejemplo, en el caso de la proteína F derivada de la cepa Edmonston del sarampión, FcΔ30 se referiría a una proteína F que tiene una porción citoplasmática con la secuencia de aminoácidos "RGR".

20 Por el contrario, la porción citoplasmática de la proteína H, HN o G se encuentra en el extremo N-terminal. Por lo tanto, se comienza a contar en el segundo residuo de aminoácido del extremo N-terminal de la proteína H, HN o G (es decir, omitiendo el primer residuo de metionina) cuando se determina la secuencia deseada. En el documento WO2008037458A2 se divulga que el dominio citoplasmático de la proteína F del sarampión puede estar truncado para que comprenda al menos 1 residuo de aminoácido cargado positivamente y la porción citoplasmática de la proteína H puede truncarse para que comprenda al menos 9 residuos de aminoácidos consecutivos de la porción citoplasmática C-terminal de la proteína H más una metionina adicional en el extremo N-terminal. Sin embargo, se espera que sea factible un truncamiento adicional de la porción citoplasmática de la proteína H, si la proteína H se trunca para permitir un pseudotipado eficiente y aún tiene una función de soporte de fusión.

25 Las modificaciones que permiten el truncamiento para un pseudotipado eficiente pueden combinarse con modificaciones que suprimen la función de unión al receptor nativo.

30 El experto en la técnica podrá introducir fácilmente mutaciones como, por ejemplo, adiciones y delecciones, en una secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos dada.

35 Las proteínas de la presente invención incluyen además homólogos funcionales. Una proteína se considera un homólogo funcional de otra proteína para una función particular, si el homólogo tiene una función similar a la proteína original. El homólogo puede ser, por ejemplo, un fragmento de la proteína, o un mutante de sustitución, adición o delección de la proteína.

40 La determinación de si dos secuencias de aminoácidos son sustancialmente homólogas se basa normalmente en búsquedas FASTA. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de una primera proteína se considera homóloga a la de una segunda proteína si la secuencia de aminoácidos de la primera proteína comparte al menos aproximadamente un 70 % de identidad de secuencia de aminoácidos, preferiblemente al menos aproximadamente un 80 % de identidad y, más preferiblemente, al menos aproximadamente un 85 %, 90 %, 95 % o 99 % de identidad, con la secuencia de la segunda proteína.

45 Los términos "psi positivo" y "psi negativo", como se usan en la presente solicitud, se refieren a una molécula de ácido nucleico en donde el elemento psi retroviral está presente y ausente, respectivamente. El elemento psi es una señal que actúa en cis ubicada cerca del extremo 5' del genoma retroviral y designa una señal de empaquetamiento, que es importante durante el ensamblaje de los virus y conduce a la incorporación del ARN viral en el núcleo viral. Por lo tanto, un ARN psi negativo no comprende el elemento psi retroviral y, en consecuencia, no se ensamblará en una partícula de vector de la presente invención; por el contrario, un ARN psi positivo que sí comprende dicho elemento psi se ensamblará eficazmente en la partícula de vector.

50 Los términos "título" o "eficiencia de transducción" se usan como un medio para caracterizar y comparar las partículas de vector con respecto a su capacidad para transducir sus células diana. Por lo tanto, las partículas de vector que tienen un "título aumentado" o una "eficiencia de transducción aumentada" pueden transducir un mayor número de células en un volumen de partícula de vector dado que otras partículas del vector con el mismo volumen.

El término “antígeno expresado en la superficie de una célula (diana)” o “marcador (de superficie) celular”, como se usa en la presente invención, se refiere a una molécula presente en la superficie de una célula, preferentemente en una célula diana. Tales moléculas pueden ser, entre otros, péptidos o proteínas que pueden comprender cadenas de azúcar o lípidos, grupos de diferenciación (CD), anticuerpos o receptores. Dado que no todas las poblaciones de células expresan los mismos marcadores celulares, un marcador celular puede usarse por lo tanto para identificar, seleccionar o aislar una población de células dada que exprese un marcador celular específico. Como ejemplo, CD4 es un marcador celular expresado por células T auxiliares, células T reguladoras y células dendríticas. Por lo tanto, las células T auxiliares, las células T reguladoras y las células dendríticas pueden identificarse, seleccionarse o aislarse de otro modo, entre otras, mediante un clasificador de células FACS, por medio del marcador celular CD4.

El término “polipéptido etiquetado” como se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido que tiene unido al mismo directa o indirectamente al menos un componente adicional, es decir, la etiqueta. El polipéptido etiquetado como se usa en el presente documento es capaz de unirse a un antígeno expresado en una célula diana. El polipéptido puede ser un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a un antígeno expresado en la superficie de una célula diana, tal como un antígeno asociado a tumor en una célula cancerosa. El polipéptido del polipéptido etiquetado puede ser, alternativamente, una citocina o un factor de crecimiento u otro polipéptido soluble que sea capaz de unirse a un antígeno de una célula diana.

El término “adaptador” o “molécula adaptadora” como se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido etiquetado que puede unirse a un antígeno de una célula diana, por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, y que tiene unido al mismo directa o indirectamente al menos un componente adicional, es decir, la etiqueta. El adaptador o la molécula adaptadora puede ser un anticuerpo etiquetado o un fragmento de unión a antígeno del mismo, una citocina o un factor de crecimiento u otro polipéptido soluble que sea capaz de unirse a un antígeno de una célula diana.

La etiqueta puede ser, por ejemplo, un hapteno o dextrano, y al hapteno o dextrano puede unirse el dominio de unión a antígeno del polipéptido que comprende un dominio de unión a antígeno específico para la etiqueta. Los haptenos, como por ejemplo FITC, biotina, PE, estreptavidina o dextrano, son moléculas pequeñas que provocan una respuesta inmunitaria solo cuando se unen a un portador grande, como una proteína; el portador puede ser uno que tampoco provoque una respuesta inmunitaria por sí mismo. Una vez que el cuerpo ha generado anticuerpos frente a un aducto de hapteno-portador, el hapteno de molécula pequeña también puede unirse al anticuerpo, pero habitualmente no iniciará una respuesta inmunitaria; habitualmente, solo el aducto de hapteno-portador puede hacer esto.

El término “polipéptido que comprende un dominio de unión a antígeno específico para una etiqueta” como se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido que puede unirse a una etiqueta de un polipéptido etiquetado. El polipéptido etiquetado es diferente del polipéptido que comprende el dominio de unión a antígeno específico para la etiqueta. El polipéptido que comprende el dominio de unión a antígeno específico para una etiqueta puede ser un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a dicha etiqueta del polipéptido etiquetado.

Como alternativa, el “polipéptido etiquetado” puede ser una “molécula de unión a célula diana” (TCBM) a la que se une el dominio de unión a antígeno del polipéptido fusionado que comprende el dominio de unión a antígeno específico para una etiqueta, en donde dicho dominio de unión a antígeno ahora es un dominio de unión a epítipo anti-enlazador/etiqueta (LLE), es decir, una variante específica de un dominio de unión a etiqueta. El sistema adaptable de la partícula de vector retroviral o partícula similar a virus de la misma que usa TCBM y la partícula (vector) como se divulga en el presente documento se describe brevemente a continuación.

La partícula de vector lentiviral o gammaretroviral o partícula similar a virus de la misma como se divulga en el presente documento puede comprender un polipéptido que comprende un dominio de unión a antígeno específico para un LLE de una TCBM fusionado a la proteína truncada que tiene actividad de unión a receptor, por ejemplo, proteína H, en donde dicho dominio de unión a antígeno específico para un LLE es capaz de discriminar entre una molécula de origen natural en un sujeto y una molécula de unión a célula diana (TCBM) que comprende una molécula de unión a antígeno (ABM), un resto de etiqueta (LaM) y un resto de enlazador (LiM), en donde dicho LiM conjuga dicha ABM y dicho LaM. La ABM puede ser la parte polipeptídica de dicho polipéptido etiquetado. El resto de etiqueta (LaM) puede ser una molécula de origen natural en un sujeto o un derivado de la misma. El resto de enlazador (LiM) puede estar acoplado al resto de etiqueta (LaM). LiM y LaM representan juntos la parte de etiqueta de dicho polipéptido etiquetado. La partícula de vector retroviral o partícula similar a virus de la misma con el dominio de unión a LLE une TCBM con LaM y un determinado LiM con mayor afinidad que el resto de etiqueta endógeno sin resto de enlazador. De este modo, se logra un mejor reconocimiento/unión de TCBM en condiciones fisiológicas en donde podría estar presente el LaM endógeno.

El beneficio de este enfoque es que el LaM que permite un sistema adaptable de partícula de vector retroviral o partícula similar a virus de la misma no es inmunogénico, ya que es una molécula de origen natural endógena del sujeto. El LaM es un autoantígeno, el LaM acoplado al LiM es un autoantígeno modificado, que construye un epítipo nuevo, el epítipo de enlazador/etiqueta (LLE), y el LLE se une mejor al dominio de unión a LLE del polipéptido que comprende el dominio de unión a antígeno específico para el LLE que la molécula de origen natural en el sujeto.

La molécula de origen natural puede ser una molécula presente en el sistema circulatorio de un sujeto, pero a la que se une con una afinidad menor que al TCBM el sistema de vector retroviral como se divulga en el presente documento.

Preferentemente, la molécula de origen natural en un sujeto puede ser una molécula extracelular o una molécula con estructura extracelular parcial, más preferentemente, la molécula de origen natural en un sujeto puede ser una proteína no nuclear humana.

5 El resto de enlazador y el resto de etiqueta forman parte de la molécula de unión a célula diana (TCBM) que también comprende un resto de unión a antígeno (ABM), en donde el resto de enlazador conjuga el LaM y el ABM. Generalmente, dicho ABM se dirige contra un antígeno expresado en la superficie de una célula diana.

10 Mediante la administración de TCBM junto con la partícula de vector retroviral adaptable o partícula similar a virus de la misma como se divulga en el presente documento, se seleccionan como diana únicamente aquellas células que expresan el antígeno (marcador) en la superficie de las células diana, transduciendo de ese modo selectivamente las células diana. El sistema adaptable de partícula de vector retroviral o partícula similar a virus de la misma como se divulga en el presente documento puede usarse como sistema de partícula de vector retroviral o partícula similar a virus de la misma "universal" para seleccionar como diana una amplia variedad de células diana, por ejemplo, una amplia variedad de tumores sin la necesidad de preparar constructos separados de partícula de vector retroviral o partícula similar a virus de la misma. El epítipo de etiqueta/enlazador (LLE) de la TCBM reconocido por el dominio de unión a LLE del polipéptido que comprende dicho dominio de unión a LLE también puede permanecer constante. Solo es necesario alterar la ABM de la TCBM para permitir que el sistema seleccione como diana células diana de identidad diferente.

15 El dominio de unión anti-LLE de dicho polipéptido utiliza TCBM como puente entre la partícula de vector retroviral o partícula similar a virus de la misma y las células diana que expresan el antígeno.

20 La TCBM comprende un resto de etiqueta (LaM) en un extremo de la molécula y un resto de unión a antígeno (ABM) en el otro extremo, conectados por un resto de enlazador. El único requisito para la identidad del resto de etiqueta es únicamente que debe ser una molécula de origen natural en un sujeto (un autoantígeno) y que la variante conjugada del resto de enlazador de la misma pueda reconocerse y unirse por un dominio de unión a LLE de dicho polipéptido con mayor afinidad por la variante conjugada del resto de enlazador de la misma (el autoantígeno modificado) que por la variante de origen natural conjugada sin resto de enlazador.

25 Toda molécula que pueda ser capaz de generar un LLE puede usarse como resto de enlazador. El único requisito para la identidad de un resto de enlazador es que el resto de enlazador pueda conjugarse químicamente (o acoplarse) a una resto de etiqueta o codificarse genéticamente (de manera recombinante) y debe ser capaz de generar un nuevo epítipo en el contexto, la interfaz y/o el entorno del resto de enlazador y el resto de etiqueta. El LiM puede ser preferentemente una molécula que no provoca o no tiende a provocar una reacción inmunitaria en el sujeto, por ejemplo, el LiM es un autoantígeno. En este caso, la interfaz del LaM y el LiM genera un nuevo epítipo, el LLE.

30 El LiM puede seleccionarse, por ejemplo, del grupo que consiste en péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidratos de carbono, polihidroxicarbohidratos, cadenas alquílicas, ácidos alcanoicos, ácidos carboxílicos (por ejemplo, ácido ϵ -aminocaproico (ácido 6-aminohexanoico) o ácido 6-(6-aminohexanamido)hexanoico), farnesilos, polietilenglicoles, lípidos y derivados de los mismos.

35 Un LiM especialmente preferido puede ser un resto 6-(6-aminohexanamido)hexanoílo, por ejemplo, derivado de ácido 6-(6-aminohexanamido)hexanoico o éster activo de 6-(6-aminohexanamido)hexanoico, o un resto 6-aminohexanoílo, por ejemplo, derivado de ácido 6-aminohexanoico o éster activo de 6-aminohexanoico. El sistema de partículas de vector retroviral adaptable o partículas similares a virus de las mismas puede ser un sistema que tiene un polipéptido que comprende un dominio de unión a LLE, en donde dicho LaM es biotina y dicho LiM es un de enlazador de 6-(6-aminohexanamido)hexanoílo o un resto de enlazador de 6-aminohexanoílo.

40 El término "anticuerpo" como se usa en el presente documento se usa en el sentido más amplio para cubrir las diversas formas de estructuras de anticuerpos que incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos monoclonales y policlonales (incluidos anticuerpos de longitud completa), anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), fragmentos de anticuerpos, es decir, fragmentos de unión a antígeno de un anticuerpo, inmunoadhesinas y quimeras anticuerpo-inmunoadhesina, que reconocen específicamente (es decir, se unen) a un antígeno. Los "fragmentos de unión a antígeno" comprenden una porción de un anticuerpo de longitud completa, preferiblemente el dominio variable del mismo, o al menos el sitio de unión a antígeno del mismo ("un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo"). Los ejemplos de fragmentos de unión a antígeno incluyen Fab (fragmento de unión a antígeno), scFv (fragmento variable de cadena sencilla), anticuerpos de dominio único, diacuerpos, dsFv, Fab', diacuerpos, moléculas de anticuerpo de cadena sencilla y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

55 Tal como se usa en el presente documento, el término "antígeno" pretende incluir sustancias que se unen a o provocan la producción de uno o más anticuerpos y pueden comprender, pero no se limitan a, proteínas, péptidos, polipéptidos, oligopéptidos, lípidos, hidratos de carbono como dextrano, haptenos y combinaciones de los mismos, por ejemplo, una proteína glicosilada o un glicolípido. El término "antígeno" como se usa en el presente documento se refiere a una entidad molecular que puede expresarse en la superficie de una célula diana y que puede reconocerse por medio del sistema inmunitario adaptativo, incluidos, pero sin restringirse a, anticuerpos o TCR, o moléculas diseñadas por ingeniería genética, incluidos, entre otros, TCR endógenos o transgénicos, CAR, scFv o multímeros de los mismos, fragmentos Fab o multímeros de los mismos, anticuerpos o multímeros de los mismos, anticuerpos de cadena sencilla o multímeros de

los mismos, o cualquier otra molécula que pueda ejecutar la unión a una estructura con alta afinidad.

El término "expresión" como se usa en el presente documento se define como la transcripción y/o traducción de una secuencia de nucleótidos particular impulsada por su promotor en una célula.

5 El término "epítopo" significa la parte de un antígeno que puede reconocer el sistema inmunitario, específicamente por anticuerpos, células B o células T. Por ejemplo, el epítopo es la parte específica del antígeno a la que se une un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

Los términos "epítopo de enlazador/etiqueta" (LLE) o "epítopo de etiqueta/enlazador" como se usan en el presente documento pueden usarse indistintamente y se refieren a un epítopo formado por el contexto, la interfaz y/o el entorno del resto de enlazador conjugado y el resto de etiqueta de la TCBM como se divulga en el presente documento.

10 El epítopo generado por el acoplamiento del resto de etiqueta con un resto de enlazador no se produce de forma natural en un sujeto. El epítopo generado comprende una parte de dicho LaM y una parte de dicho LiM. Preferentemente, el LLE no provoca o no tiende a provocar una reacción inmunitaria en un sujeto que se pretende tratar con el sistema adaptable como se divulga en el presente documento. El único requisito para el LLE es que sea un epítopo para el polipéptido que comprende el dominio de unión a LLE. Un dominio de unión a LLE de dicho polipéptido como se divulga en el presente documento que se deriva de una molécula de reconocimiento de epítopos, tal como un anticuerpo que reconoce el epítopo de etiqueta/enlazador, se une con una mayor preferencia al epítopo recién creado, es decir, el epítopo de etiqueta/enlazador (el autoantígeno modificado), que al resto de etiqueta endógeno sin resto de enlazador, es decir, la molécula de origen natural en el sujeto (el autoantígeno).

20 Dicho dominio de unión a LLE se une con una afinidad al menos dos veces, preferentemente al menos 5 veces, más preferentemente al menos 10 veces mayor a dicho LLE que a dicha molécula de origen natural.

25 El "sistema circulatorio" es un sistema orgánico de un sujeto que permite que la sangre circule y transporte nutrientes (como aminoácidos y electrolitos), oxígeno, dióxido de carbono, hormonas y células sanguíneas hacia y desde las células del cuerpo para proporcionar nutrición y ayudar a combatir enfermedades, estabilizar la temperatura y el pH y mantener la homeostasis. El sistema circulatorio comprende dos sistemas separados: el sistema cardiovascular, que distribuye la sangre, y el sistema linfático, que hace circular la linfa.

30 El término "molécula de origen natural en un sujeto o un derivado de la misma" como se usa en el presente documento se refiere a moléculas o sustancias en un sujeto, preferentemente dichas moléculas se encuentran extracelularmente o tienen al menos una parte extracelular, por ejemplo, una proteína que atraviesa la membrana. La molécula de origen natural puede existir en forma libre o unida covalente o no covalentemente a otra molécula, por ejemplo, unida a una proteína. Por ejemplo, la biotina existe en forma libre circulando en el sistema sanguíneo, pero también unida a, por ejemplo, una proteína plasmática.

35 Debido a este requisito, estas moléculas no son inmunogénicas, ya que son moléculas endógenas (autoantígenos) del sujeto. A modo de ejemplo, la biotina es una molécula de origen natural en un sujeto, ya que es una molécula circulatoria en el sistema sanguíneo (sistema circulatorio) de un sujeto. El término "derivado de la misma" significa en este contexto que dicha molécula de origen natural en un sujeto puede experimentar algunas modificaciones menores sin cambiar la naturaleza de dicha molécula. Dichas modificaciones no son idénticas a la conjugación del resto de enlazador con dicha molécula. El término "tumor" se conoce médicamente como neoplasia. No todos los tumores son cancerosos; los tumores benignos no invaden tejidos vecinos y no se propagan por todo el cuerpo.

40 El término "cáncer" se conoce médicamente como una neoplasia maligna. El cáncer es un amplio grupo de enfermedades que implican un crecimiento celular descontrolado e incluye todos los tipos de leucemia. En el cáncer, las células (células cancerosas) se dividen y crecen sin control, formando tumores malignos e invadiendo partes cercanas del cuerpo. El cáncer también puede propagarse a partes más distantes del cuerpo a través del sistema linfático o el torrente sanguíneo. Existen más de 200 tipos diferentes de cáncer conocidos que afectan a los seres humanos.

Ejemplos

45 Ejemplo 1: Principio del sistema de vector retroviral adaptable

50 Las proteínas de la envuelta con actividad de unión a antígeno con interacción reducida o suprimida con sus receptores nativos se equiparon con scFv específicos para biotina (SEQ ID NO: 1 y 2), clon Bio3-18E) y dextrano (SEQ ID NO: 13 y 14), respectivamente. Para el scFv específico de biotina, puede aplicarse el principio de LLE (FIG 1C) como se divulga en el presente documento, es decir, el dominio de unión a antígeno del scFV Bio3-18E se une con mayor preferencia a la biotina (LaM) que está acoplada al resto 6-(6-aminohexanamido)hexanoilo o un resto 6-aminohexanoilo (LiM) que a la biotina libre o biotina acoplada con otros enlazadores. LiM conecta la biotina y el resto de unión a antígeno (ABM) de la molécula de unión a la diana (TCBM).

55 Dos cadenas de los scFV están unidas por medio de un enlazador 3(G4S) (SEQ ID NO: 11) y pueden estar presentes en cualquiera de las orientaciones (VH-VL o VL-VH). La orientación puede influir en los niveles de expresión, la estabilidad, la afinidad con la etiqueta del polipéptido etiquetado y el título del vector retroviral pseudotipado o partícula similar a virus

del mismo, respectivamente. Se ha añadido una etiqueta His (SEQ ID NO: 12) al extremo C-terminal de la proteína con actividad de unión a antígeno, para permitir la medición de la expresión de superficie mediante citometría de flujo (FIG 2).

El ADN que codifica el scFV del anticuerpo específico de dextrano (SEQ ID NO: 13 y 14) y el anticuerpo específico de biotina (SEQ ID NO: 1 y 2) en orientación VH-VL se obtuvieron por síntesis génica (ATUM, Newark, California). Se insertaron los sitios de restricción flanqueantes Sfil y NotI para permitir la inserción en el plásmido pCG-Hmut que codifica Hmut digerido con Sfil y NotI (Anliker *et al.* (2010)). El ADN que codifica el scFV específico de biotina en orientación VL-VH se obtuvo por PCR usando un plásmido que codifica el scFV en orientación VL-VH con cebadores que añaden los sitios de restricción. El scFV amplificado se insertó por medio de Sfil y NotI en el plásmido que codifica Hmut digerido como se describió anteriormente. La expresión de superficie celular de las proteínas recombinantes con actividad de unión a antígeno es crucial en cuanto a productividad del vector retroviral pseudotipado o partícula similar a virus del mismo. La expresión de superficie se determinó mediante la transfección transitoria de células HEK-293T que se sembraron en 6 pocillos con una densidad de 8×10^5 células/pocillo el día anterior a la transfección. De cada constructo, se transfectoron 1,5 µg de ADN. Dos días después de la transfección, una parte de las células se tiñó con anticuerpos específicos de la etiqueta His según las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotec, n.º de cat. 130-092-691), seguido de citometría de flujo para determinar la proporción de células positivas para His (FIG 3A). Otra parte de las células se tiñó con un anticuerpo específico para CD25 conjugado con biotina y una proteína fluorescente (Miltenyi Biotec, n.º de cat. 130-019-010). Las células HEK-293T son negativas para CD25, lo que significa que solo se detecta la proteína con actividad de unión a antígeno que contiene el scFV Bio3-18E. De ese modo, la cuantificación de células marcadas puede correlacionarse indirectamente con la capacidad de unión a antígeno de la proteína de la envuelta (FIG 3B).

20 Ejemplo 2: Generación de un vector retroviral pseudotipado y específico de etiqueta

Se generaron partículas del vector retroviral pseudotipadas específicas para una etiqueta de polipéptido etiquetado mediante transfección transitoria de células HEK-293T. Las células HEK-293T que se sembraron en matraces T175 en DMEM/FCS al 10 % (Biowest, n.º de cat. 12362; Biochrom, n.º de cat. S0415) el día anterior se transfectoron con un plásmido que codifica la proteína H, un plásmido que codifica la proteína F, un plásmido de empaquetamiento que codifica gag/pol/rev y un plásmido de vector de transferencia psi-positivo que codifica GFP. Las partículas del vector retroviral pseudotipadas se recogieron 48 h después de la transfección. Para eliminar los restos celulares, se recogió el sobrenadante, se centrifugó durante 10 min a 1000 rpm, seguido de filtración a través de un filtro de 0,45 µm. Para concentrar, el sobrenadante filtrado se centrifugó a través de un cojín de sacarosa al 20 % (Sigma Aldrich, n.º de cat. 84097-250 g, 20 % p/v en PBS) durante 24 h a 4 °C con 5350xg. Los vectores retrovirales sedimentados se resuspendieron en 250 µl de PBS preenfriado, se dividieron en alícuotas y se almacenaron a -80 °C para su uso posterior.

30 Ejemplo 3: Generación de polipéptidos etiquetados

Se realizó un marcaje aleatorio de proteínas como anticuerpos o fragmentos de los mismos con LC-LC-biotina según protocolos bien conocidos en la técnica. Los anticuerpos o fragmentos de los mismos volvieron a tamponarse en 1x PBS/EDTA 2 mM/BSA al 0,5 % mediante el paso por unidades de filtro Amicon Ultra-15 equilibradas según las instrucciones del fabricante. Se añadió biotina-LC-LC-NHS a la proteína vuelta a tamponar seguido de una incubación a temperatura ambiente (21 °C) durante 1 h. La biotina-LC-LC-NHS restante se eliminó mediante filtración en gel. Se determinó el contenido proteico de las fracciones recogidas. La biotilación se confirmó mediante la incubación del anticuerpo marcado o fragmento del mismo en una línea celular que expresa el antígeno de dicho anticuerpo o fragmento del mismo. El anticuerpo etiquetado unido se detectó con un anticuerpo anti-biotina conjugado con fluorocromo (Miltenyi Biotec, n.º de cat. 130-104-563) y citometría de flujo.

40 Ejemplo 4: Titulación de un vector retroviral pseudotipado y específico de etiqueta

Se titularon partículas de vector viral pseudotipadas en células HT1080 en ausencia del polipéptido etiquetado. Por lo tanto, las proteínas en la superficie celular se marcaron aleatoriamente con LC-LC-biotina usando biotina-LC-LC-NHS. HT1080 resuspendido en 1 ml de PBS se complementó con biotina-LC-LC-NHS seguido de una incubación a 4 °C con mezclado constante. Después de eliminar el sobrenadante libre de células, las células se lavaron y se sembraron con 1×10^5 células/pocillo en 24 pocillos en medio de cultivo (DMEM, FCS al 10 %) hasta que las células eran completamente adherentes. La biotilación exitosa se confirmó mediante tinción con un anticuerpo anti-biotina conjugado con fluorocromo (Miltenyi Biotec, n.º de cat. 130-090-856) y citometría de flujo (FIG 4A). Las partículas de vector que codifica GFP se diluyeron en serie en un DMEM que contenía Polybrene® (Sigma Aldrich, n.º de cat. H9268-5G). 72 h después de la transducción, se determinó la eficiencia de transducción por citometría de flujo determinando la proporción de células positivas para GFP (FIG 4A). La proporción de células positivas para GFP, el factor de dilución y el volumen de retroviral aplicado se usan para calcular el título de vector retroviral (es decir, unidades de transducción por volumen (TU/ml) (FIG 4B).

50 Ejemplo 5: Transducción de líneas celulares con vector retroviral

La transducción de células HT1080 no biotinizadas se realiza como se describe (ejemplo 4).

Se transdujeron células Raji a $3,3 \times 10^5$ células/ml en placas de 48 pocillos en RPMI, glutamina estable 2 mM (Biowest, n.º de cat. L0501-500; Lonza, n.º de cat. 882027-12) (FIG 5-11). Se añadió vector retroviral a las células, que se cultivaron durante al menos 72 h hasta que se realizó la citometría de flujo para determinar la proporción de células transducidas y

el título calculado. Se transdujeron SupT1 a 1×10^6 células/ml en RPMI, glutamina estable 2 mM, se sembraron en placas de 96 pocillos con fondo en U (FIG 7, 8, 11). Se añadió vector retroviral a las células, que se cultivaron durante al menos 72 h hasta que se realizó la citometría de flujo para determinar la proporción de células transducidas y el título calculado. Se transdujeron células Jurkat en placas de 48 pocillos a una densidad celular de 2×10^6 células/ml en RPMI, glutamina estable 2 mM (FIG 5, 7, 9, 10). Se añadió vector retroviral a las células, que se cultivaron durante al menos 72 h hasta que se realizó citometría de flujo para determinar la proporción de células transducidas y el título calculado. Para verificar la expresión del antígeno expresado por la célula diana, se realizó tinción con el polipéptido etiquetado seguido de un anticuerpo frente a α -biotina marcado con fluorescencia (Miltenyi Biotec, n.º de cat. 130-090-856) y se realizó análisis citométrico de flujo.

10 Ejemplo 6: Transducción selectiva con sistema de vector retroviral adaptable

Para transducir selectivamente células diana con vectores retrovirales específicos de etiqueta y polipéptidos etiquetados específicos para antígenos seleccionados, se sembraron células diana en un medio sin suero como se describió anteriormente (ejemplo 5). Se añadieron anticuerpos etiquetados o fragmentos Fab etiquetados a las células en una concentración de 100 ng/ml a 1000 ng/ml (FIG 7, 11, 12). Las células se incubaron con polipéptido etiquetado durante al menos 30 min a 4 °C. Después de eso, se añadió vector retroviral que codifica GFP. Se demostró selectividad en poblaciones celulares mixtas con cantidades iguales de células Raji y SupT1 a una densidad total de 1×10^6 células/ml en placas de 48 pocillos. Se aplicó el protocolo de transducción específico de Raji (FIG 8).

Ejemplo 7: Optimización del sistema de vector retroviral adaptable

El rendimiento y la aplicabilidad del sistema de vector retroviral adaptable se mejoraron fácilmente determinando el mejor orden de combinación de células, vector retroviral específico de etiqueta y polipéptido etiquetado en conjunto. Por lo tanto, se preincubaron dos componentes seguido de la adición del tercer componente. Este ensayo se realizó con α -CD20-Ab-etiqueta como polipéptido, vector retroviral específico de etiqueta que codifica GFP y Raji (CD20+) como células diana o células Jurkat (CD20-) como células no diana. En primer lugar, se combinaron α -CD20-Ab-etiqueta y vector retroviral en 300 μ l de RPMI para células Raji o 150 μ l para células Jurkat usando 1 μ g/ml de α -CD20-Ab-etiqueta y una dosis de vector retroviral de MOI 0,05. Después de la incubación a 4 °C durante 30 minutos, las células diana, ya sean Raji o Jurkat, se resuspendieron en la mezcla preincubada de vector retroviral/polipéptido etiquetado. Se realizó citometría de flujo al menos 72 horas después de la transducción (FIG 5A).

En segundo lugar, se preincubaron células diana o no diana con el vector retroviral, las células se sembraron en medio RPMI (150 μ l para Jurkat, 300 μ l para Raji). El vector viral se añadió a las células con una MOI de 0,05, seguido de incubación a 37 °C durante 30 min. Después de eso, se añadió la molécula adaptadora en una concentración final de 1 μ g/ml. La citometría de flujo se realizó al menos 72 h después de la transducción (FIG 5B). Para la unión inicial del adaptador a las células, las células diana se sembraron en 150 μ l para Jurkat o 300 μ l para células Raji en RPMI y la molécula adaptadora se añadió a una concentración final de 1 μ g/ml. Después de la incubación durante 30 min a 4 °C, se añadió el vector viral que codifica GFP. La citometría de flujo se realizó al menos 72 h después de la transducción (FIG 5C). Para las tres condiciones del protocolo, se añadió RPMI suplementado con FCS al 10 % después de 4 h de preincubación hasta un volumen final de 1 ml.

Para aumentar la eficiencia de la transducción, se usó Vectofusin-1® (Miltenyi Biotec, n.º de cat. 130-111-163) (FIG 6C). Se preparó Vectofusin-1® en RPMI directamente antes de la transducción. El volumen del vector retroviral se mezcló 1:2 con el volumen correspondiente de Vectofusin-1® durante 5 min antes de la transducción. Luego, la mezcla se añadió a las células: 50 μ l para células Jurkat o 100 μ l para células Raji. Como control, se aplicó Polybrene® (Sigma Aldrich, n.º de cat. H9268-5G) (FIG 6B).

La concentración óptima de la molécula adaptadora se determinó a modo de ejemplo para polipéptidos etiquetados específicos de CD4 y CD20 en células Jurkat (FIG 10A) o células Raji (FIG 10B). Por lo tanto, se usó el protocolo con unión inicial de las moléculas adaptadoras con las células.

Para demostrar selectividad en condiciones propensas a inducir una transducción inespecífica, las células se transdujeron en presencia de suero, en presencia de polipéptidos no etiquetados y con una alta dosis de vector retroviral (FIG 9).

Ejemplo 8: Método de cribado

En este ejemplo, la partícula de vector retroviral pseudotipada o partícula similar a virus de la misma se usa para determinar la especificidad de un polipéptido etiquetado desconocido mediante la incubación del polipéptido etiquetado desconocido con células definidas o con una mezcla de células. La partícula de vector retroviral pseudotipada o partícula similar a virus de la misma codifica un marcador que permite determinar el tipo de célula al que se une el polipéptido etiquetado desconocido. Este enfoque puede llevarse a cabo *in vitro* o *in vivo* usando, por ejemplo, pero sin restringirse a, modelos de ratón.

Ejemplo 9: Adaptador-LV que usa proteínas de la envuelta de Nipah para pseudotipado

El adaptador-LV pseudotipado con proteínas de la envuelta de Nipah se generó modificando el protocolo como se describió anteriormente (ejemplo 2) usando plásmidos que codifican las proteínas G y F de Nipah en lugar de los plásmidos que codifican las proteínas H y F del virus del sarampión. Las partículas de vector retroviral pseudotipadas se titularon en células Raji en presencia de α -CD20-Ab-etiqueta como polipéptido. Se aplicó el protocolo de transducción específico de Raji como se describió anteriormente. Las partículas de vector retroviral que codifica GFP se diluyeron en serie en RPMI. 72 h después de la transducción, se determinó la eficiencia de transducción mediante citometría de flujo, determinando la proporción de células positivas para EGFP. La proporción medida de células positivas para GFP, el factor de dilución y el volumen de retroviral aplicado se usó para calcular el título de vector retroviral (es decir, unidades de transducción por volumen (TU/ml)). Las células Raji positivas para CD19, positivas para CD20 sembradas en medio sin suero se transdujeron selectivamente con vectores retrovirales pseudotipados con proteína de la envuelta de Nipah específicos de etiqueta como se describió anteriormente (ejemplo 5). El adaptador etiquetado se añadió a las células a una concentración de 100 ng/ml durante al menos 30 min a 4 °C. Posteriormente, se añadieron vectores retrovirales pseudotipados con proteína de la envuelta de Nipah que codifican GFP. La eficiencia de transducción se determinó 3 días después de la transducción mediante análisis citométrico de flujo (FIG 13).

Ejemplo 10: Administración dirigida de proteínas usando adaptador-VLP

Se produjeron VLP retrovirales pseudotipadas modificando el protocolo de producción de vectores retrovirales (ejemplo 2). Se transfectaron células HEK con los plásmidos que codifican la proteína H de sarampión específica de etiqueta, plásmidos que codifican la proteína F de sarampión, plásmidos que codifican gag/pol/rev y plásmidos que codifican gag/pol/rev/transgén que contienen un transgén de elección insertado entre la matriz y la proteína de la cápside. Como transgén, se usó eGFP o proteína fluorescente roja monomérica. Las proteínas fluorescentes se liberan en las partículas maduras mediante la adición de sitios de escisión de proteasa de VIH-1 flanqueantes (Uhlig *et al.* (2015)). Las VLP se titularon como se describió anteriormente (ejemplo 4). Por el contrario, el análisis se realizó ya 4 h después de la adición de las VLP. Para transferir selectivamente proteínas fluorescentes, se añadieron VLP específicas de etiqueta a células SupT1 positivas para CD4, positivas para CD8 en medio sin suero en ausencia (sin) o presencia de moléculas adaptadoras etiquetadas o no etiquetadas específicas para el antígeno expresado por células SupT1 (ejemplo 5). La concentración del adaptador se fijó en 100 ng/ml (100 ng /ml para α -CD8-AB). Después de la incubación de las células con el adaptador durante al menos 30 min a 4 °C, se añadieron VLP a una MOI de 0,05. 4 horas después, se midió la tasa de transferencia de proteínas mediante citometría de flujo, FIG 14A y 14B.

30

Referencias

- Anliker, B., Abel, T., Kneissl, S., Hlavaty, J., Caputi, A., Brynza, J., Schneider, I.C., Munch, R.C., Petznek, H., Kontermann, R.E., *et al.* (2010). Specific gene transfer to neurons, endothelial cells and hematopoietic progenitors with lentiviral vectors. *Nature methods* 7, 929-935.
- Bender, R.R., Muth, A., Schneider, I.C., Friedel, T., Hartmann, J., Pluckthun, A., Maisner, A., y Buchholz, C.J. (2016). Receptor-Targeted Nipah Virus Glycoproteins Improve Cell-Type Selective Gene Delivery and Reveal a Preference for Membrane-Proximal Cell Attachment. *PLoS pathogens* 12, e1005641.
- Buchholz, C., Cattaneo, R., Cichutek, K., y Funke, S. (2009). Pseudotypisierung retroviraler vektoren, verfahren zur herstellung und verwendung davon für gezielten gentransfer und screening mit hohem durchsatz, EP2066795 B9.
- Chen, X., Zaro, J.L., y Shen, W.C. (2013). Fusion protein linkers: property, design and functionality. *Advanced drug delivery reviews* 65, 1357-1369.
- Edes, I. (2016). Targeted transduction of T cell subsets for immunotherapy of cancer and infectious disease (Humboldt-Universität zu Berlin, Lebenswissenschaftliche Fakultät).
- Enkirch, T., Kneissl, S., Hoyler, B., Ungerechts, G., Stremmel, W., Buchholz, C.J., Springfield, C. (2013). Targeted lentiviral vectors pseudotyped with the Tupaia paramyxovirus glycoproteins. *Gene therapy* 20, 16-23.
- Frecha, C., Costa, C., Negre, D., Gauthier, E., Russell, S.J., Cosset, F.L., y Verhoeven, E. (2008). Stable transduction of quiescent T cells without induction of cycle progression by a novel lentiviral vector pseudotyped with measles virus glycoproteins. *Blood* 112, 4843-4852.
- Friedel, T., Hanisch, L.J., Muth, A., Honegger, A., Abken, H., Pluckthun, A., Buchholz, C.J., y Schneider, I.C. (2015). Receptor-targeted lentiviral vectors are exceptionally sensitive toward the biophysical properties of the displayed single-chain Fv. *Protein engineering, design & selection : PEDS* 28, 93-106.
- Hoop, M. (2014). Modulation of the transduction of pseudotyped lentiviral vectors and their application for the production of recombinant proteins, doi: 10.3929/ethz-b-000179875.
- Kaikkonen, M.U., Lesch, H.P., Pikkarainen, J., Raty, J.K., Vuorio, T., Huhtala, T., y Taavitsainen, M., Laitinen, T., Tuunanen, P., Grohn, O., *et al.* (2009). (Strept)avidin-displaying lentiviruses as versatile tools for targeting and dual imaging of gene delivery. *Gene therapy* 16, 894-904.
- Khetawat, D., y Broder, C.C. (2010). A functional henipavirus envelope glycoprotein pseudotyped lentivirus assay system. *Virology journal* 7, 312.

- Lee, B., Palomares, K., y Pernet, O. (2016). Nipah virus envelope pseudotyped lentiviruses and methods of their use, EP2844746 A1 .
- Liu, Y.P., Russell, S.P., Ayala-Breton, C., Russell, S.J., y Peng, K.W. (2014). Ablation of nectin4 binding compromises CD46 usage by a hybrid vesicular stomatitis virus/measles virus. *Journal of virology* 88, 2195-2204.
- Masse, N., Ainouze, M., Neel, B., Wild, T.F., Buckland, R., y Langedijk, J.P. (2004). Measles virus (MV) hemagglutinin: evidence that attachment sites for MV receptors SLAM and CD46 overlap on the globular head. *Journal of virology* 78, 9051-9063.
- Masse, N., Barrett, T., Muller, C.P., Wild, T.F., y Buckland, R. (2002). Identification of a second major site for CD46 binding in the hemagglutinin protein from a laboratory strain of measles virus (MV): potential consequences for wild-type MV infection. *Journal of virology* 76, 13034-13038.
- Metzner, C., Kochan, F., y Dangerfield, J.A. (2013). Postexit surface engineering of retroviral/lentiviral vectors. *BioMed research international* 2013, 253521.
- Morizono, K., Xie, Y., Helguera, G., Daniels, T.R., Lane, T.F., Penichet, M.L., y Chen, I.S. (2009). A versatile targeting system with lentiviral vectors bearing the biotin-adaptor peptide. *The journal of gene medicine* 11, 655-663.
- Nakamura, T., Peng, K.W., Harvey, M., Greiner, S., Lorimer, I.A., James, C.D., y Russell, S.J. (2005). Rescue and propagation of fully retargeted oncolytic measles viruses. *Nature biotechnology* 23, 209-214.
- Nakamura, T., Peng, K.W., Vongpunsawad, S., Harvey, M., Mizuguchi, H., Hayakawa, T., Cattaneo, R., y Russell, S.J. (2004). Antibody-targeted cell fusion. *Nature biotechnology* 22, 331-336.
- Palomares, K., Vigant, F., Van Handel, B., Pernet, O., Chikere, K., Hong, P., Sherman, S.P., Patterson, M., An, D.S., Lowry, W.E., *et al.* (2013). Nipah virus envelope-pseudotyped lentiviruses efficiently target ephrinB2-positive stem cell populations in vitro and bypass the liver sink when administered in vivo. *Journal of virology* 87, 2094-2108.
- Patterson, J.B., Scheifflinger, F., Manchester, M., Yilma, T., y Oldstone, M.B. (1999). Structural and functional studies of the measles virus hemagglutinin: identification of a novel site required for CD46 interaction. *Virology* 256, 142-151.
- Rasbach, A., Abel, T., Munch, R.C., Boller, K., Schneider-Schaulies, J., y Buchholz, C.J. (2013). The receptor attachment function of measles virus hemagglutinin can be replaced with an autonomous protein that binds Her2/neu while maintaining its fusion-helper function. *Journal of virology* 87, 6246-6256.

- Roux, P., Jeanteur, P., & Piechaczyk, M. (1989). A versatile and potentially general approach to the targeting of specific cell types by retroviruses: application to the infection of human cells by means of major histocompatibility complex class I and class II antigens by mouse ecotropic murine leukemia virus-derived viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 9079-9083.
- Snitkovsky, S., & Young, J.A. (2002). Targeting retroviral vector infection to cells that express heregulin receptors using a TVA-heregulin bridge protein. *Virology* 292, 150-155.
- Tahara, M., Takeda, M., Shiogane, Y., Hashiguchi, T., Ohno, S., & Yanagi, Y. (2008). Measles virus infects both polarized epithelial and immune cells by using distinctive receptor-binding sites on its hemagglutinin. *Journal of virology* 82, 4630-4637.
- Ublig, K.M., Schulke, S., Scheuplein, V.A., Malczyk, A.H., Reusch, J., Kugelmann, S., Muth, A., Koch, V., Hutzler, S., Bodmer, B.S., *et al.* (2015). Lentiviral Protein Transfer Vectors Are an Efficient Vaccine Platform and Induce a Strong Antigen-Specific Cytotoxic T Cell Response. *Journal of virology* 89, 9044-9060.
- Vongpunsawad, S., Oezgun, N., Braun, W., & Cattaneo, R. (2004). Selectively receptor-blind measles viruses: Identification of residues necessary for SLAM- or CD46-induced fusion and their localization on a new hemagglutinin structural model. *Journal of virology* 78, 302-313.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende

i) una partícula de vector retroviral pseudotipada o partícula similar a virus de la misma que comprende:

5 a) una proteína de la envuelta con actividad de unión a antígeno, en donde dicha proteína de la envuelta es una proteína recombinante que no interactúa con al menos uno de sus receptores nativos y está fusionada en su ectodominio a un polipéptido que comprende un dominio de unión a antígeno específico para una etiqueta de un polipéptido etiquetado, y en donde dicha proteína de la envuelta es la proteína H de un virus de la familia Paramyxoviridae, en donde dicha proteína H de un virus de la familia Paramyxoviridae carece de al menos una parte de la región citoplasmática de dicha proteína H,

10 b) una proteína de la envuelta con actividad de fusión de un virus de la familia Paramyxoviridae, en donde dicha proteína de la envuelta con actividad de fusión carece de al menos una parte de la región citoplasmática de dicha proteína de la envuelta, y

15 ii) dicho polipéptido etiquetado, en donde dicho polipéptido etiquetado se une específicamente a un antígeno expresado en la superficie de una célula diana, transduciendo de ese modo la célula diana con dicha partícula de vector retroviral o induciendo de ese modo la captación de la partícula similar a virus en la célula diana,

en donde dicho virus Paramyxoviridae es un virus del género *morbillivirus*, y

en donde dicha partícula de vector retroviral es una partícula de vector lentiviral o gammaretroviral.

2. Una composición que comprende

i) una partícula de vector retroviral pseudotipada o partícula similar a virus de la misma que comprende:

20 a) una proteína de la envuelta con actividad de unión a antígeno, en donde dicha proteína de la envuelta es una proteína recombinante que no interactúa con al menos uno de sus receptores nativos y está fusionada en su ectodominio a un polipéptido que comprende un dominio de unión a antígeno específico para una etiqueta de un polipéptido etiquetado, y en donde dicha proteína de la envuelta es la proteína G de un virus de la familia Paramyxoviridae, en donde dicha proteína G de un virus de la familia Paramyxoviridae carece de al menos una parte de la región citoplasmática de dicha proteína G,

b) una proteína de la envuelta con actividad de fusión de un virus de la familia Paramyxoviridae, en donde dicha proteína de la envuelta con actividad de fusión carece de al menos una parte de la región citoplasmática de dicha proteína de la envuelta, y

30 ii) dicho polipéptido etiquetado, en donde dicho polipéptido etiquetado se une específicamente a un antígeno expresado en la superficie de una célula diana, transduciendo de ese modo la célula diana con dicha partícula de vector retroviral o induciendo de ese modo la captación de la partícula similar a virus en la célula diana,

en donde dicho virus Paramyxoviridae es un virus del género *Henipavirus*, y

en donde dicha partícula de vector retroviral es una partícula de vector lentiviral o gammaretroviral.

35 3. La composición según la reivindicación 1 o 2, en donde dicha proteína de la envuelta con actividad de unión a antígeno no es trópica humana.

4. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicha transducción o dicha captación inducida es al menos 10 veces mayor en dichas células diana que en células no diana en presencia de dicho polipéptido etiquetado.

40 5. La composición según la reivindicación 1, en donde dicho virus del género *morbillivirus* es un virus del sarampión o la cepa Edmonston del virus del sarampión.

6. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el polipéptido de dicho polipéptido etiquetado es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a dicho antígeno expresado en la superficie de dicha célula diana, y en donde la etiqueta de dicho polipéptido etiquetado es un hapteno.

45 7. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6,

en donde el polipéptido de dicho polipéptido etiquetado es un resto de unión a antígeno (ABM), en donde la etiqueta de dicho polipéptido etiquetado es un epítipo de enlazador/etiqueta (LLE) de una molécula de unión a célula diana (TCBM) que comprende

- i) un resto de unión a antígeno (ABM), en donde dicho ABM se une específicamente a dicho antígeno expresado en la superficie de dicha célula diana,
- ii) un resto de etiqueta (LaM), en donde dicho LaM es una molécula de origen natural en un sujeto o un derivado de la misma,
- 5 iii) un resto de enlazador (LiM) que conjuga dicho ABM y dicho LaM, formando de ese modo un epítipo de enlazador/etiqueta (LLE),
- en donde dicho dominio de unión a antígeno de dicho polipéptido específico para una etiqueta es un dominio de unión a epítipo de etiqueta/enlazador (LLE),
- 10 en donde dicho dominio de unión a LLE se une a dicho LLE con una preferencia mayor que dicha molécula de origen natural.
8. La composición según la reivindicación 7, en donde dicho dominio de unión a LLE se une con una afinidad al menos dos veces mayor a dicho LLE que a dicha molécula de origen natural.
9. La composición según la reivindicación 7 u 8, en donde dicho LaM es biotina o un derivado de la misma y dicho LiM es un resto 6-(6-aminohexanamido)hexanoílo o un resto 6-aminohexanoílo.
- 15 10. La composición según la reivindicación 9, en donde dicho dominio de unión a LLE comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1 (VH) y SEQ ID NO: 2 (VL).
11. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde dicho polipéptido que comprende un dominio de unión a antígeno específico para una etiqueta de un polipéptido etiquetado es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo.
- 20 12. La composición según la reivindicación 11, en donde dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de dicho dominio de unión a antígeno específico para una etiqueta de un polipéptido etiquetado es un Fab (fragmento de unión a antígeno), scFv (fragmento variable de cadena sencilla), anticuerpo de dominio único, diacuerpo, dsFv, Fab' o un anticuerpo de cadena sencilla.
13. Una composición farmacéutica que comprende la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que opcionalmente comprende además un portador farmacéuticamente aceptable.
- 25 14. Un método *in vitro* para la transducción de células diana con una partícula de vector retroviral pseudotipada o la administración de las proteínas de la partícula similar a virus de la misma que comprende las etapas
- a) preincubación de células diana con un polipéptido etiquetado, y
- 30 b) adición de dicha partícula de vector retroviral o partículas similares a virus de la misma a las células diana preincubadas de la etapa a),
- en donde dicho polipéptido etiquetado se une específicamente a un antígeno expresado en la superficie de una célula diana, transduciendo de ese modo la célula diana con dicha partícula de vector retroviral o induciendo de ese modo la captación de la partícula similar a virus en la célula diana, y
- en donde dicha partícula de vector retroviral pseudotipada o partícula similar a virus de la misma comprende:
- 35 I) una proteína de la envuelta con actividad de unión a antígeno, en donde dicha proteína de la envuelta es una proteína recombinante que no interactúa con al menos uno de sus receptores nativos y está fusionada en su ectodominio a un polipéptido que comprende un dominio de unión a antígeno específico para una etiqueta de dicho polipéptido etiquetado, y en donde dicha proteína de la envuelta es la proteína H de un virus de la familia Paramyxoviridae, en donde dicha proteína H de un virus de la familia Paramyxoviridae carece de al menos una parte de la región citoplasmática de dicha proteína H,
- 40 II) una proteína de la envuelta con actividad de fusión de un virus de la familia Paramyxoviridae, en donde dicha proteína de la envuelta con actividad de fusión carece de al menos una parte de la región citoplasmática de dicha proteína de la envuelta,
- y en donde dicho virus Paramyxoviridae es un virus del género *morbillivirus*, y en donde dicha partícula de vector retroviral es una partícula de vector lentiviral o gammaretroviral, o
- 45 en donde dicha partícula de vector retroviral pseudotipada o partícula similar a virus de la misma comprende:
- i) una proteína de la envuelta con actividad de unión a antígeno, en donde dicha proteína de la envuelta es una proteína recombinante que no interactúa con al menos uno de sus receptores nativos y está fusionada en su ectodominio a un polipéptido que comprende un dominio de unión a antígeno específico para una etiqueta de dicho polipéptido etiquetado, y en donde dicha proteína de la envuelta es la proteína G de un virus de la familia Paramyxoviridae, en donde dicha
- 50

proteína G de un virus de la familia Paramyxoviridae carece de al menos una parte de la región citoplasmática de dicha proteína G,

5 ii) una proteína de la envuelta con actividad de fusión de un virus de la familia Paramyxoviridae, en donde dicha proteína de la envuelta con actividad de fusión carece de al menos una parte de la región citoplasmática de dicha proteína de la envuelta,

y en donde dicho virus Paramyxoviridae es un virus del género *Henipavirus*, y en donde dicha partícula de vector retroviral es una partícula de vector lentiviral o gammaretroviral.

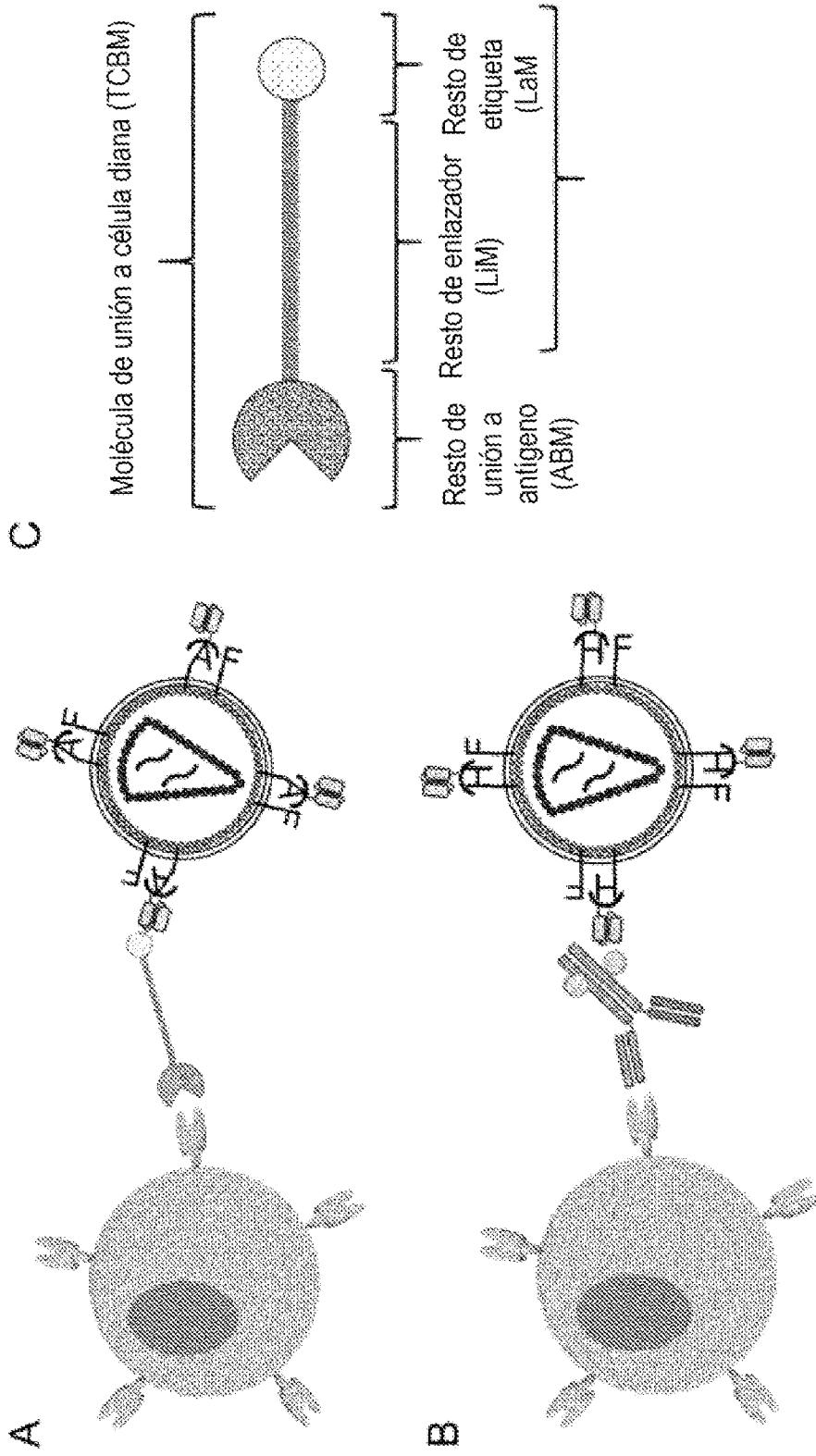


FIG 1A-C

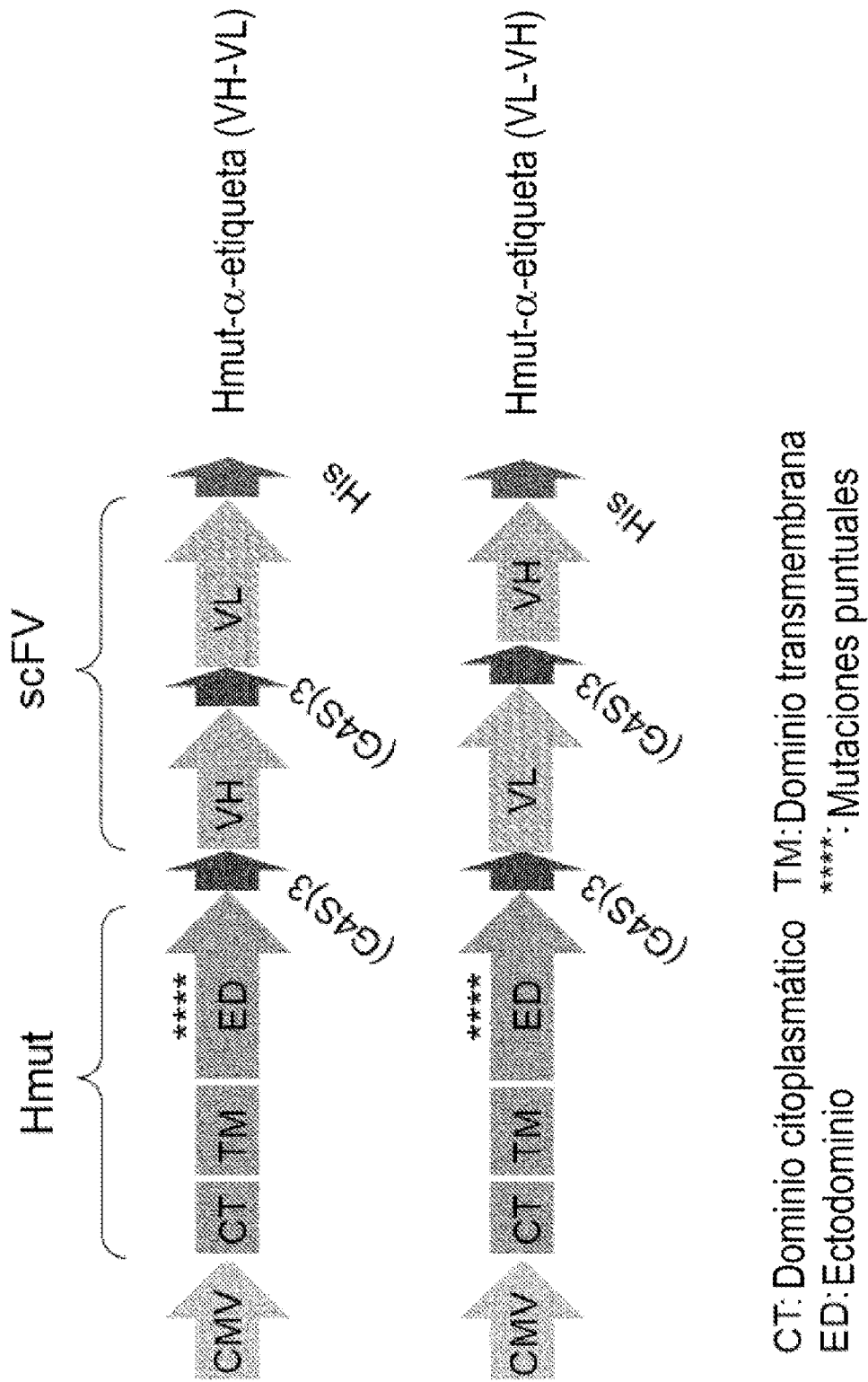


FIG 2

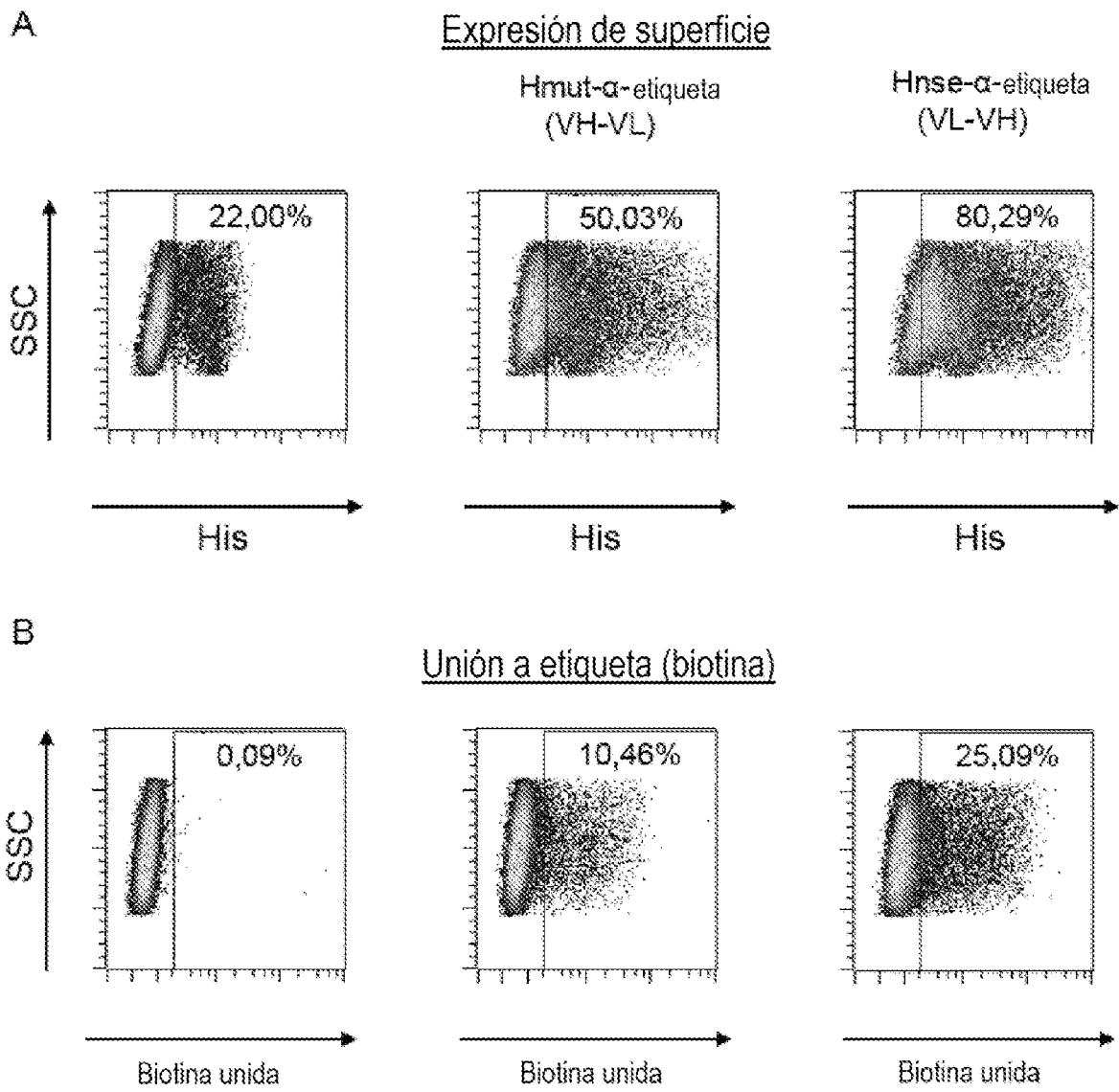
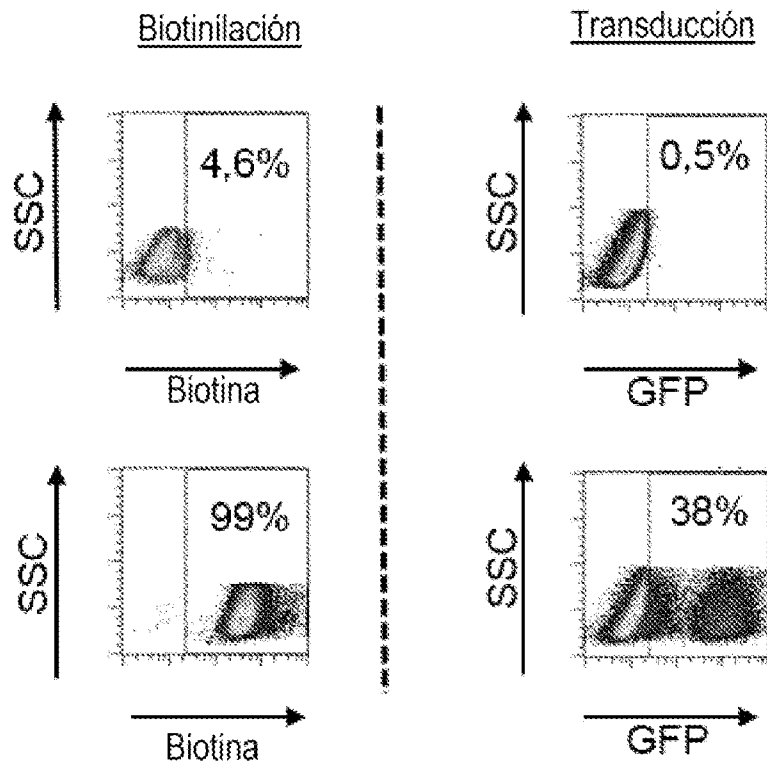


FIG 3A-B

A



B

Vector	Titulo
α -CD46-LV	$1,5 \times 10^5$ TU/ml
α -CD20-LV	$1,71 \times 10^6$ TU/ml
α -etiqueta-LV (VH-VL)	$9,5 \times 10^4$ TU/ml
α -etiqueta-LV (VL-VH)	$2,1 \times 10^5$ TU/ml

FIG 4A-B

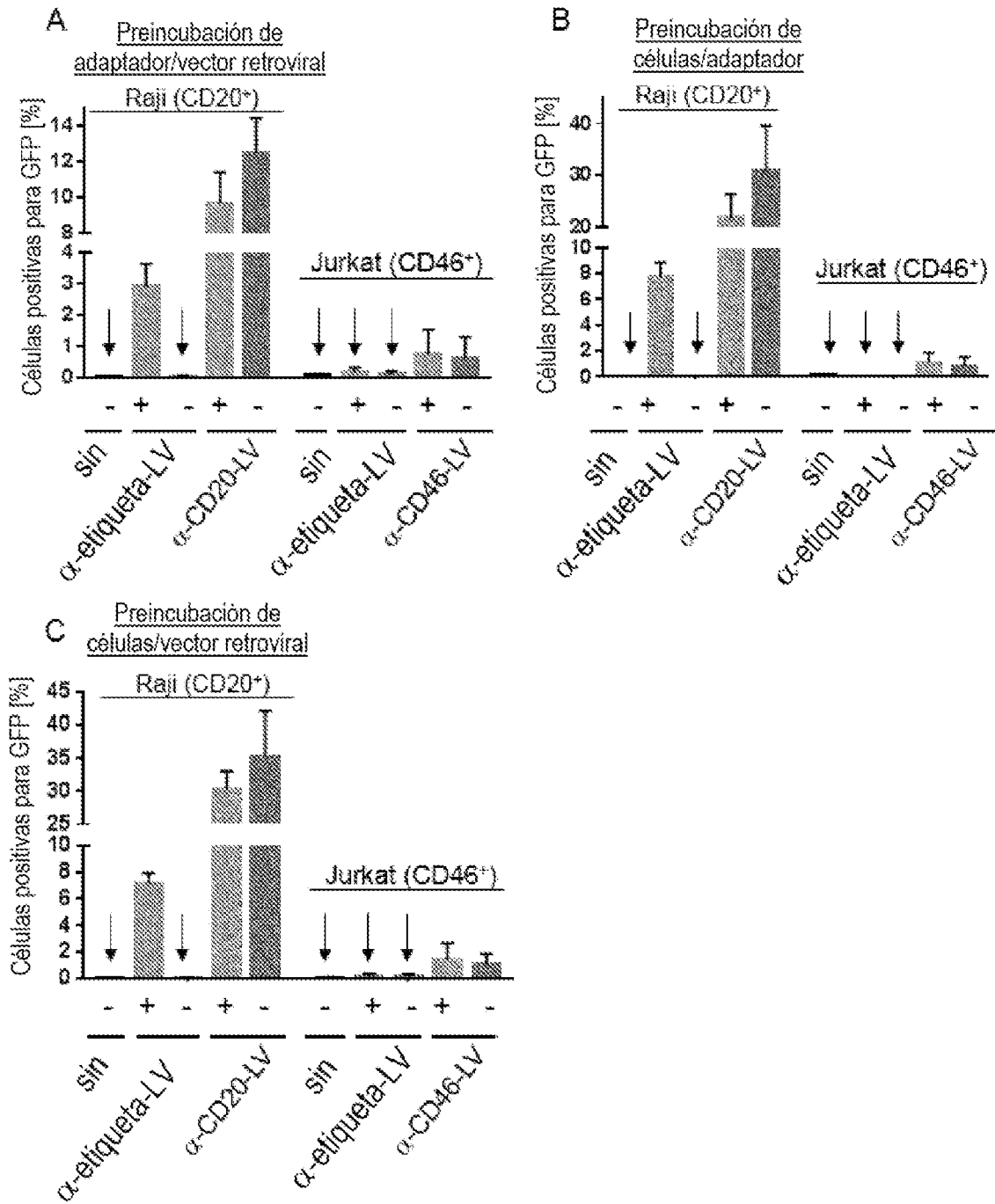


FIG 5A-C

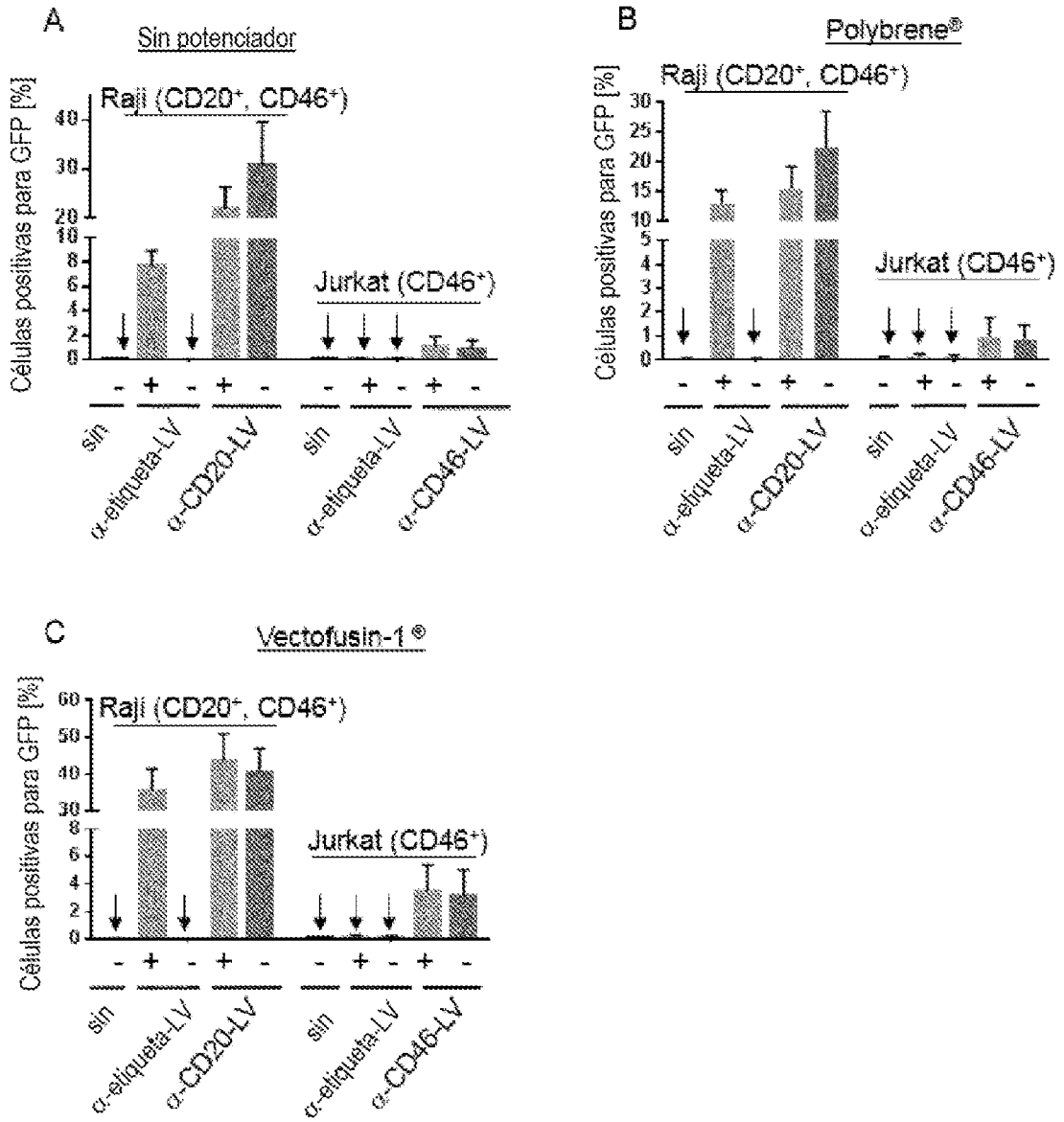


FIG 6A-C

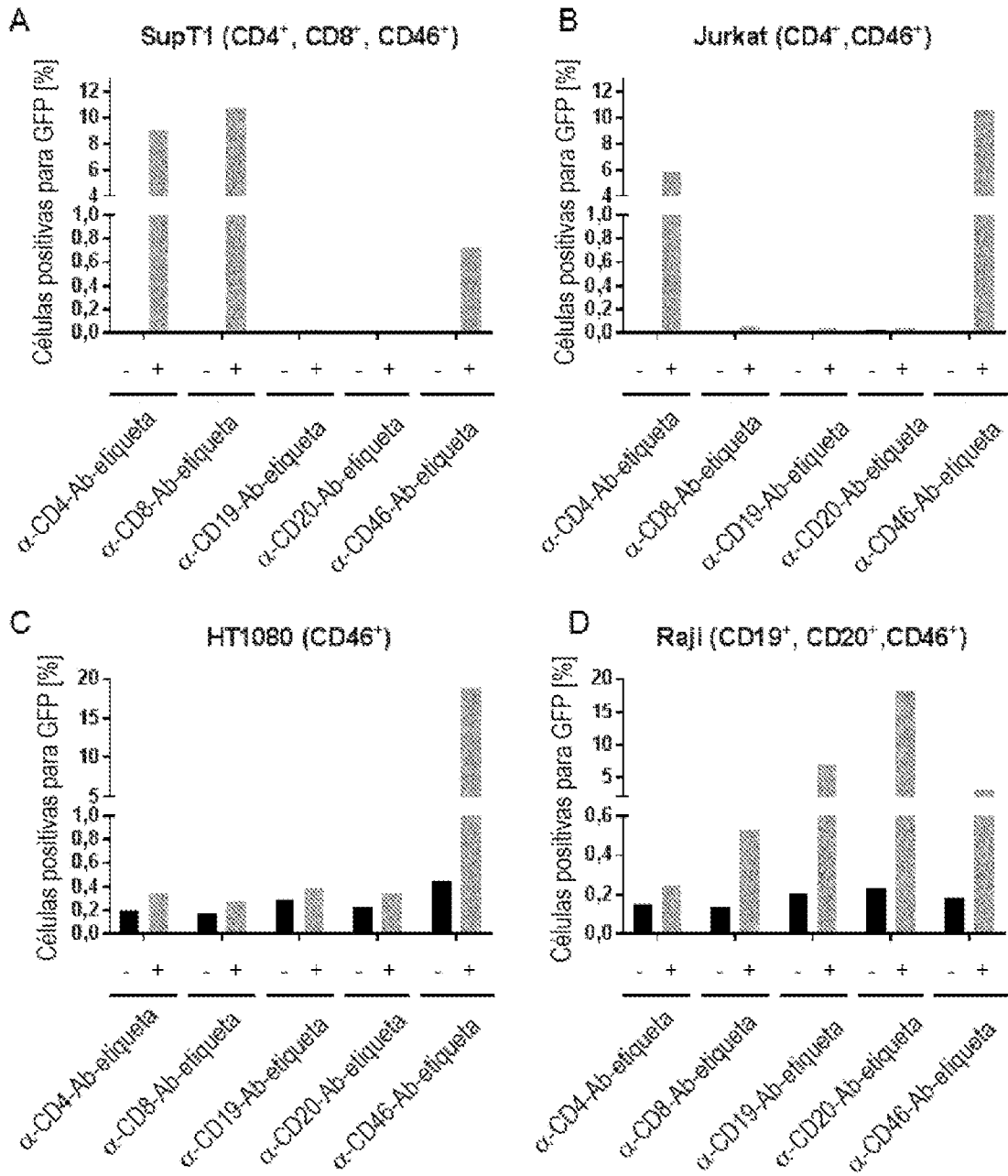


FIG 7A-D

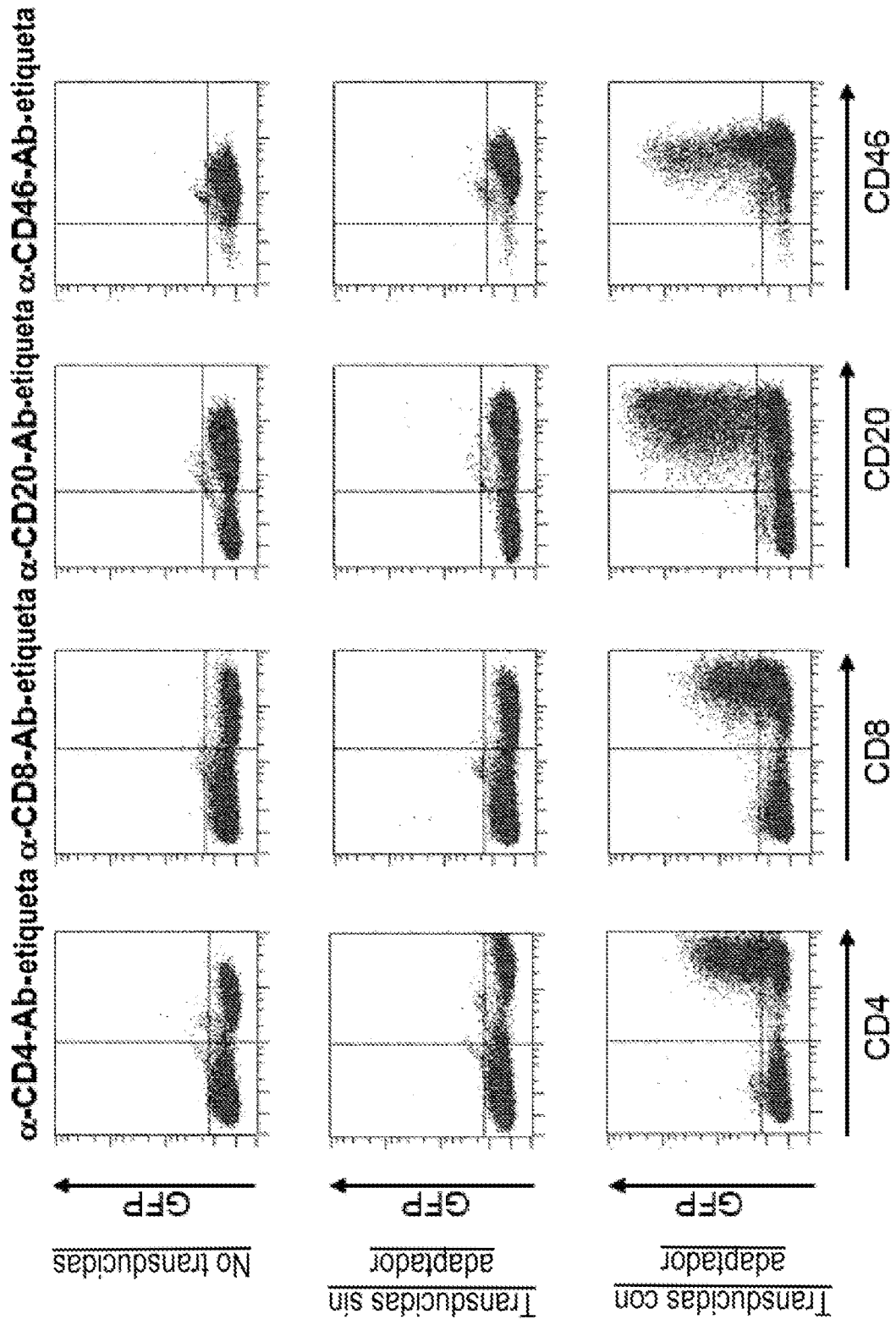


FIG 8A

		Fuera de diana (cuadrantes izquierdos)		En la diana (cuadrantes derechos)	
		GFP-	GFP+	GFP-	GFP+
No transducidas	α -CD4-Ab-etiq.	99,71%	0,29%	99,63%	0,37%
	α -CD8-Ab-etiq.	99,78%	0,22%	99,83%	0,17%
	α -CD20-Ab-etiq.	100,00%	0,00%	99,81%	0,19%
	α -CD46-Ab-etiq.	100,00%	0,00%	99,70%	0,30%
Transducidas sin adaptador	α -CD4-Ab-etiq.	99,77%	0,23%	99,50%	0,50%
	α -CD8-Ab-etiq.	99,71%	0,29%	99,97%	0,03%
	α -CD20-Ab-etiq.	100,00%	0,00%	99,83%	0,17%
	α -CD46-Ab-etiq.	100,00%	0,00%	99,71%	0,29%
Transducidas con adaptador	α -CD4-Ab-etiq.	99,15%	0,85%	50,40%	49,60%
	α -CD8-Ab-etiq.	99,18%	0,82%	63,49%	36,51%
	α -CD20-Ab-etiq.	99,89%	0,11%	52,23%	47,77%
	α -CD46-Ab-etiq.	91,30%	8,70%	88,85%	11,15%

FIG 8B

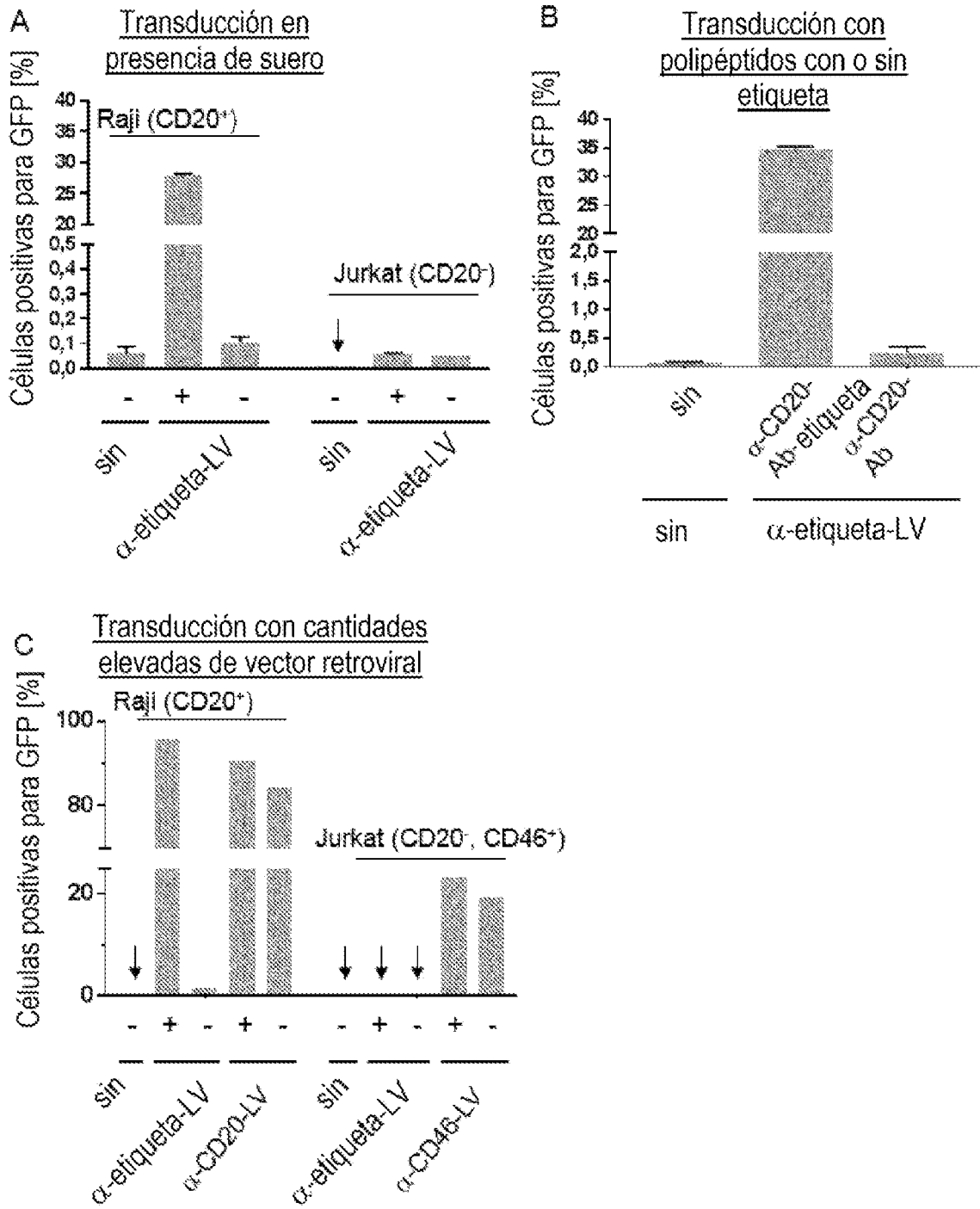


FIG 9A-C

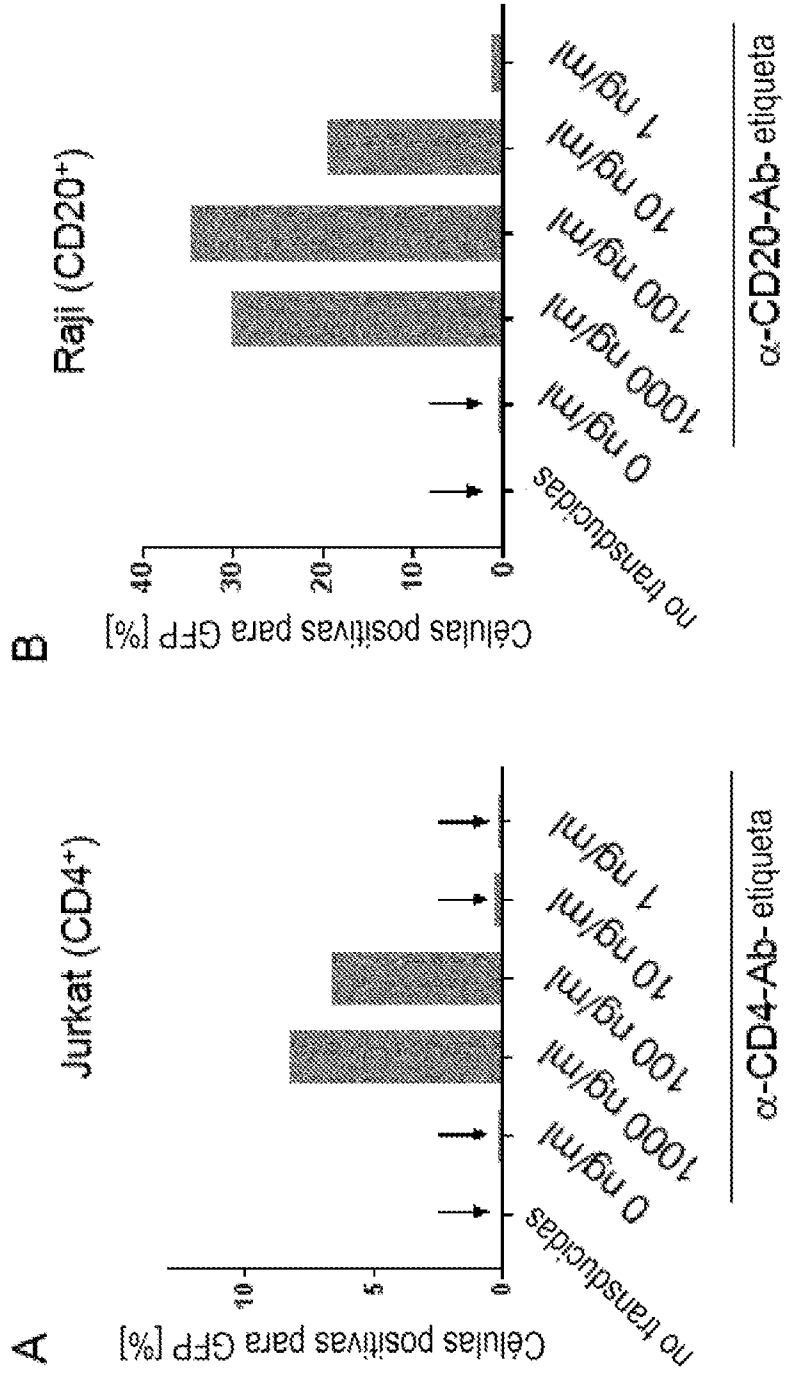


FIG 10A-B

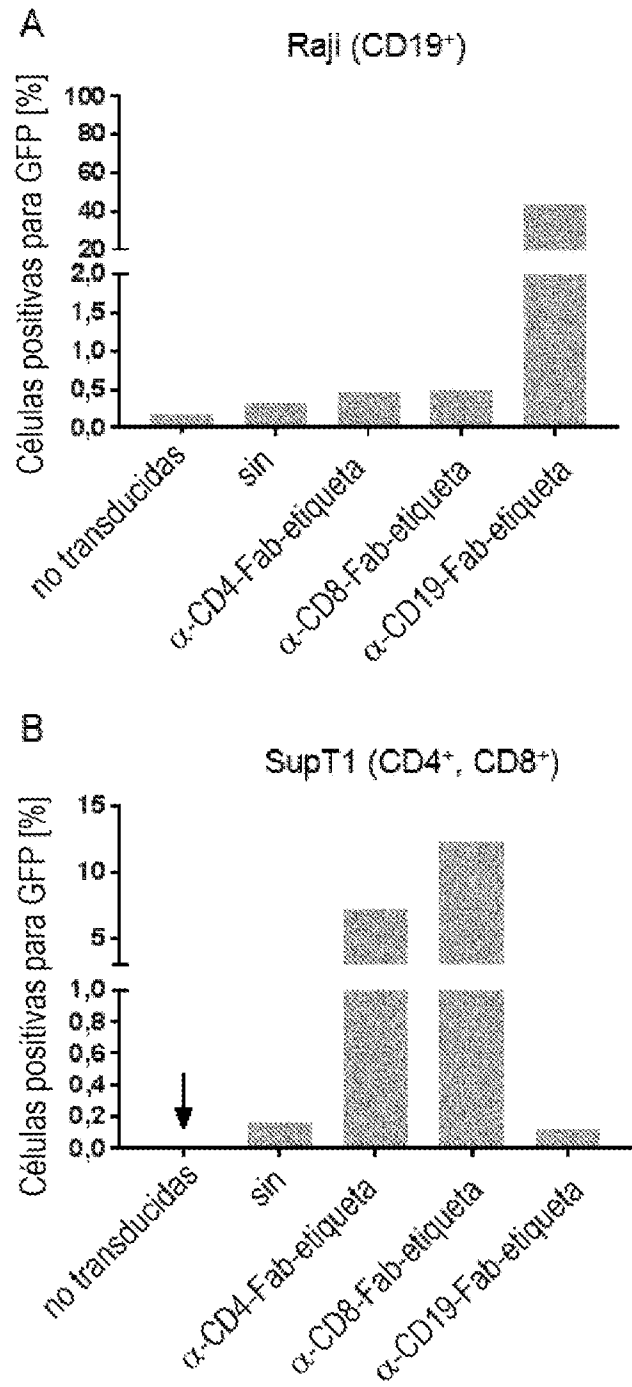


FIG 11A-B

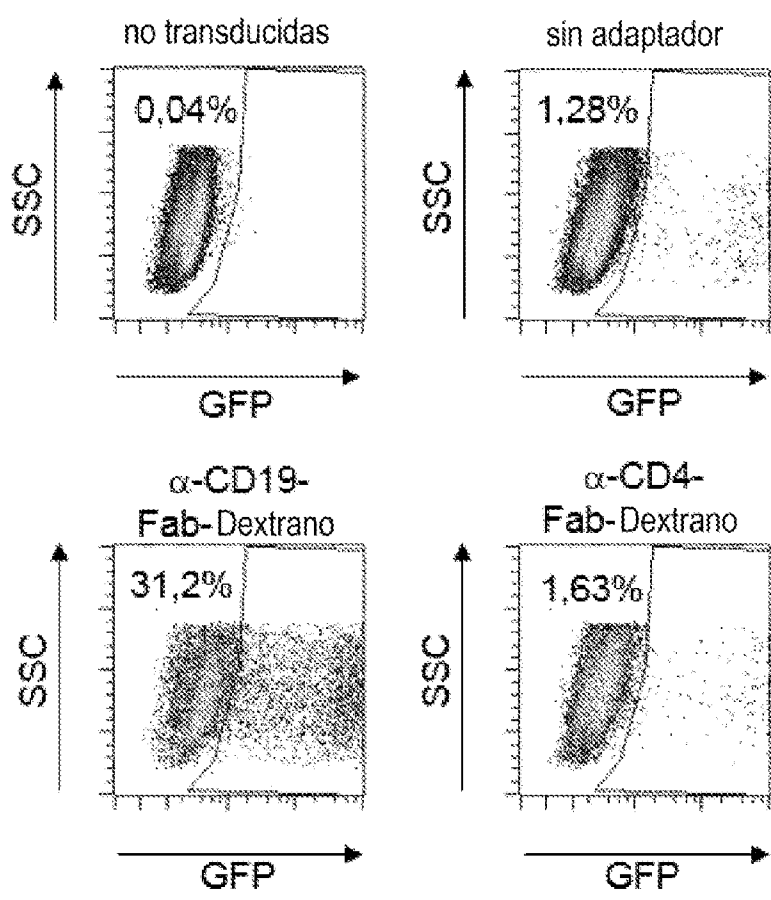


FIG 12

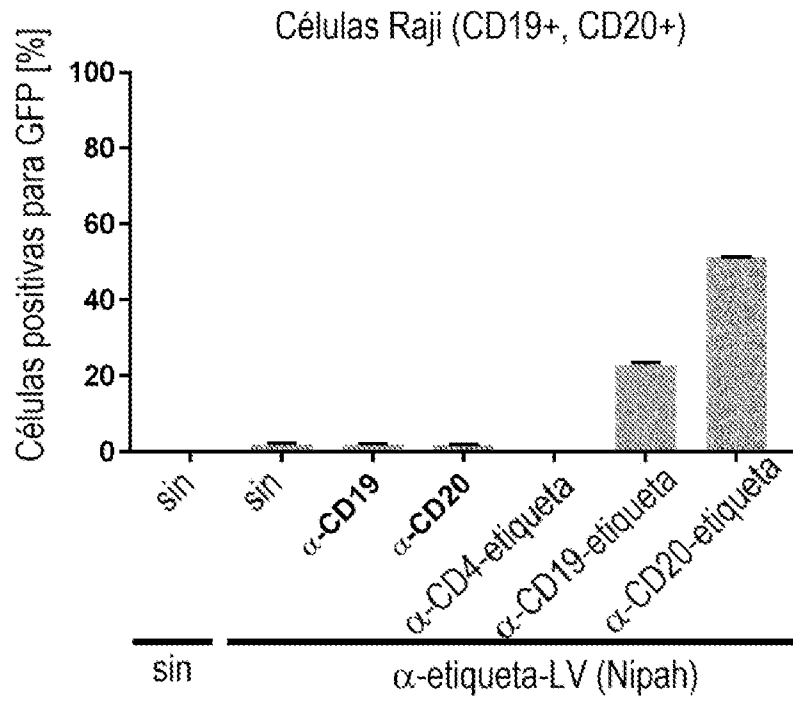


FIG 13

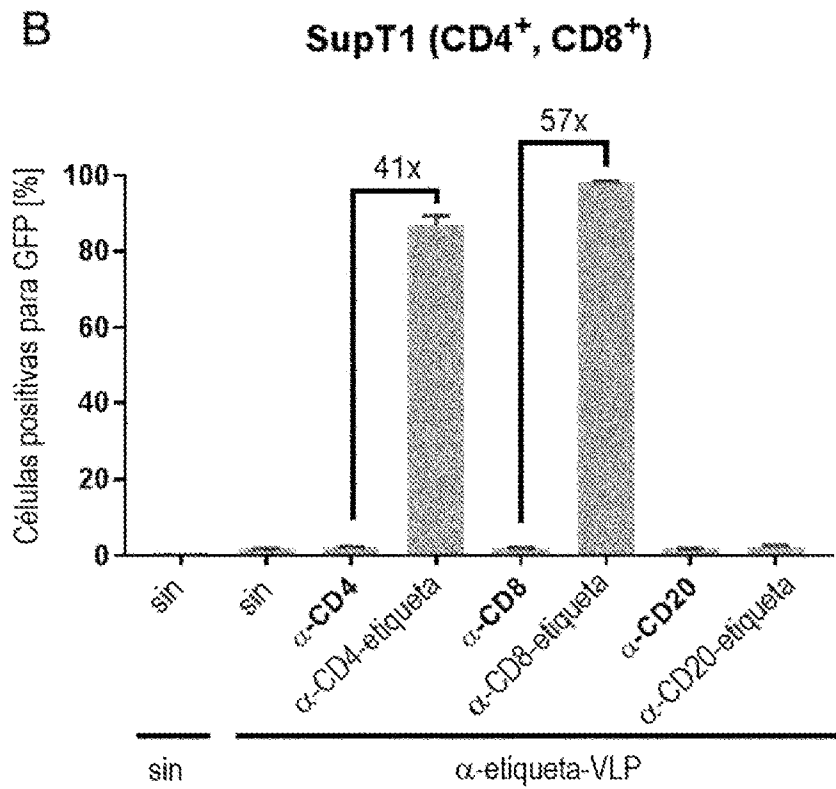
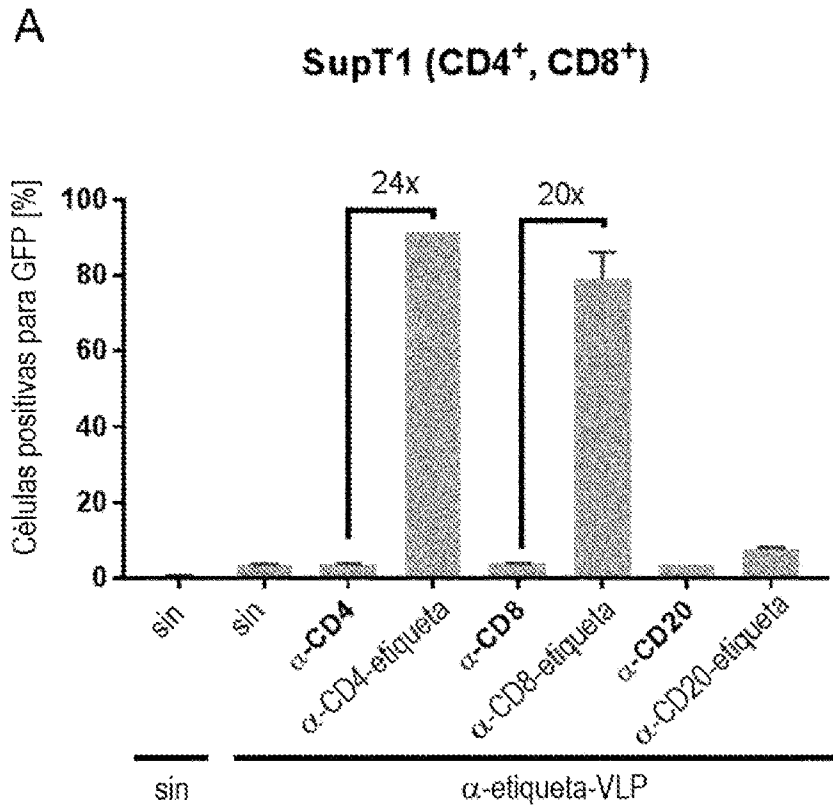


FIG 14