



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 991 922**

⑮ Int. Cl.:

A61K 9/51 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.01.2019 PCT/IB2019/000361**

⑦ Fecha y número de publicación internacional: **01.08.2019 WO19145796**

⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.01.2019 E 19743691 (8)**

⑩ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2024 EP 3740199**

④ Título: **Vectores virales encapsulados en polímeros para terapia genética**

⑩ Prioridad:

**17.01.2018 US 201862618156 P
24.04.2018 US 201862661990 P
06.08.2018 US 201862715007 P**

⑤ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.12.2024

⑩ Titular/es:

**IXAKA FRANCE (100.0%)
1 Mail du Professeur Georges Mathé
94800 Villejuif, FR**

⑦ Inventor/es:

**BAUCHE, CECILE;
VAILLANT, RENAUD;
SARRY, EMELINE;
MOURLANE, FREDERIC y
BISHOP, PHILIPPE**

⑩ Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 991 922 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

Vectores virales encapsulados en polímeros para terapia genética

Antecedentes

5 La terapia génica consiste en introducir material genético exógeno en las células diana para corregir anomalías genéticas o tratar una enfermedad modificando la función celular. Para ello se han utilizado métodos de introducción de genes tanto virales como no virales, pero ambos enfoques aún presentan importantes deficiencias.

10 Ya se han trasladado a la clínica un número de aplicaciones de vectores virales, ya sea para terapia génica o para protocolos de vacunación. Sin embargo, los vectores virales que se utilizan actualmente tienen determinadas desventajas. Por ejemplo, es complicado dirigirse a células específicas utilizando un vector viral. En algunos protocolos de terapia génica, el direccionamiento celular se logra purificando las células diana y transduciéndolas *ex vivo* y expandiendo las células transducidas *in vitro* antes de reimplantarlas en el paciente. En los protocolos de vacunación, se realiza una inyección directa del vector y a menudo se utiliza una transducción celular no específica para provocar una respuesta inmunitaria contra el producto génico codificado por el vector. Para aumentar la eficacia y la seguridad del tratamiento, podría ser necesario el direccionamiento celular.

15 Existe la necesidad de contar con sistemas mejorados basados en vectores virales para la administración dirigida de material genético.

Sumario

20 La tecnología descrita en el presente documento proporciona composiciones de nanopartículas de vectores virales empaquetados sintéticos y métodos para utilizarlas con el fin de proporcionar una administración potenciada de material genético para su uso en terapia génica y aplicaciones de vacunas. Las composiciones de vectores y los métodos se pueden emplear en cualquier situación en la que la transducción de células con uno o más transgenes sea útil. Por ejemplo, se pueden utilizar para el tratamiento del cáncer, enfermedades infecciosas, enfermedades metabólicas, enfermedades neurológicas o afecciones inflamatorias, o para corregir defectos genéticos.

25 Las composiciones de nanopartículas de vector viral de la presente tecnología incluyen una cubierta exterior que contiene un polímero o una mezcla de polímeros que encapsulan el vector.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a una nanopartícula que comprende un vector viral recubierto con un polímero o una mezcla de polímeros, en la que el vector viral comprende un transgén, y en la que la nanopartícula funciona como un vehículo para entregar el transgén a células eucariotas, en la que el vector viral carece de proteína de envoltura.

30 En determinadas realizaciones, el polímero o la mezcla de polímeros comprende un poli(beta-aminoéster) que tiene la fórmula general



en la que cada Pep es un oligopéptido, en la que R es OH, CH₃ o un colesterol, y en la que m varía desde 1 a 20, n varía desde 1 a 100 y o varía desde 1 a 10.

35 En realizaciones preferidas, el oligopéptido incluye al menos tres residuos de aminoácidos, seleccionados del grupo que consiste en arginina (R), lisina (K), histidina (H), ácido glutámico (E), ácido aspártico (D) y cisteína (C). Véanse también los documentos WO2014/136100 y WO2016/116887 para una descripción adicional de los PBAE derivados de oligopéptidos que se pueden utilizar en la presente tecnología. Se puede incluir cisteína para proporcionar un punto de unión covalente para el péptido al polímero; si bien lleva una ligera carga negativa a pH 7, no altera significativamente la carga si se utiliza junto con aminoácidos cargados positivamente. Los péptidos de ejemplo son CRRR (SEQ ID NO:1), CHHH (SEQ ID NO:2), CKKK (SEQ ID NO:3), CEEE (SEQ ID NO:4) y CDDD (SEQ ID NO:5). En otras realizaciones, cualquier aminoácido de origen natural puede incluirse en las unidades estructurales Pep. La secuencia del péptido se selecciona de modo que promueva la captación celular y el direccionamiento del vector recubierto de polímero. En realizaciones que utilizan y que carecen de proteínas de envoltura viral, las secuencias de 40 oligopéptidos y la carga neta se seleccionan de modo que promuevan la captación celular y/o la captación endosómica y/o el escape endosómico de los vectores virales encapsulados con los polímeros en las células diana previstas. Los péptidos en cada uno de los dos extremos del polímero normalmente son los mismos en una molécula de polímero dada, pero pueden ser diferentes. Las moléculas de polímero en una mezcla utilizada para recubrir un vector pueden 45 ser iguales o diferentes; si son diferentes, pueden diferir en el esqueleto del polímero o en los péptidos terminales. En realizaciones preferidas, el péptido en ambos extremos del polímero tiene la secuencia de aminoácidos CRRR (SEQ 50 ID NO:1).

5 ID NO:1), o CHHH (SEQ ID NO:2), o CKKK (SEQ ID NO:3), o CEEE (SEQ ID NO:4), o CDDD (SEQ ID NO:5). El polímero o la mezcla de polímeros puede tener una carga neta positiva o negativa, o puede no tener carga. Se pueden utilizar oligopéptidos que contengan 2 o más residuos de un único tipo de aminoácido, tal como R, K, H, D o E. El polímero puede comprender un azúcar o un alcohol de azúcar injertado en la cadena lateral unida a el esqueleto del polímero. Una o más de las moléculas de polímero que encapsulan cada nanopartícula del vector pueden comprender opcionalmente una unidad estructural de direccionamiento unida al polímero en cualquier posición deseada en la molécula de polímero, tal como en R. Las moléculas de polímero pueden estar reticuladas o no reticuladas. Las moléculas de polímero se pueden unir a la superficie del vector viral de forma no covalente o covalente, tal como por ejemplo mediante unión covalente a una molécula de lípido (por ejemplo, colesterol, un fosfolípido o un ácido graso) 10 que se divide en la bicapa lipídica del vector, o a una proteína incrustada en la bicapa lipídica. En algunas realizaciones, el polímero simplemente recubre el vector pero se une de forma no específica, es decir, no se une al vector mediante interacciones covalentes o no covalentes específicas, sino únicamente mediante interacciones no específicas, tales como carga neta, hidrofobicidad o interacciones de van der Waals. En determinadas realizaciones, la proporción del polímero o mezcla de polímeros con el vector retroviral es desde aproximadamente 1:100 a aproximadamente 5:1 en 15 peso, o el número de moléculas de polímero por partícula del vector es desde aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^{12} .

20 Las nanopartículas de vector viral comprenden un vector viral. El vector viral puede elegirse en base a las características deseadas (por ejemplo, inmunogenicidad, capacidad para acomodar constructos de diferentes tamaños, propiedades de integración y replicación, nivel de expresión, duración de la expresión, tropismo tisular o 25 características de direccionamiento, capacidad para infectar células en división y/o quiescentes, etc.). El vector viral puede ser un vector retroviral, tal como un vector lentiviral. En realizaciones preferidas, el vector viral es un vector retroviral. Sin embargo, la invención también puede ponerse en práctica con otros tipos de virus y/o vectores virales, incluidos los derivados de virus de ADN o ARN.

25 Las nanopartículas pueden incluir una o más unidades estructurales de direccionamiento que están expuestas en la superficie de las nanopartículas de vector encapsuladas, tales como por asociación covalente o no covalente de las unidades estructurales de direccionamiento con el recubrimiento de polímero. Una especie molecular de unidad estructural de direccionamiento, o más de una especie molecular diferente de unidad estructural de direccionamiento, puede estar presente en cada nanopartícula de vector viral. Las unidades estructurales de direccionamiento pueden ser, por ejemplo, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (incluidos Fab), scFv, armazones proteínicos similares a 30 anticuerpos, oligopéptidos, aptámeros, aptámeros de L-ARN o ligandos para receptores de superficie celular. En una realización, la unidad estructural de direccionamiento es un anticuerpo anti-CD3 o aptámero para dirigir las nanopartículas hacia las células T. En una realización, el transgén codifica un receptor de antígeno químico. La nanopartícula es capaz de actuar como un vehículo de administración de genes transducido células *in vivo* en un sujeto al que se administra el vehículo, o transducido células *in vitro*. En determinadas realizaciones, la nanopartícula es capaz de transducir un tipo específico de célula o clase de células, generalmente a través de la 35 acción de la unidad estructural de direccionamiento y/o a través de la acción del polímero o la mezcla de polímeros. En algunas realizaciones, el polímero de partículas de vector recubiertas de polímero puede promover la transducción celular, no solo mediante la unión a las superficies de las células diana, sino a través de la captación endosómica, tal como por endocitosis, micropinocitosis, fagocitosis u otros mecanismos, y el escape endosómico (a través de la fusión 40 de membranas después de una reducción del pH en la vesícula endosómica). En realizaciones preferidas, la secuencia de aminoácidos de oligopéptidos asociados con el polímero puede promover específicamente la transducción celular a través de la vía endosómica.

45 Los vectores de la invención carecen de proteínas de envoltura, lo que difiere de los vectores pseudotipados. En los vectores pseudotipados, las proteínas de envoltura, tales como el complejo gp120-gp41 del HIV o la glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G), forman estructuras similares a espinas en la superficie exterior de la envoltura viral, que facilitan la unión de las partículas del vector a las células hospedadoras y la entrada de los virus en las células hospedadoras. Las proteínas pseudotipadas, tales como VSV-G, también se pueden utilizar para proteger o unir el vector durante la purificación (por ejemplo, protección durante la ultracentrifugación, unión a una columna de afinidad u otra matriz de afinidad, o purificación en gel). Sin embargo, en el contexto del empaquetamiento de 50 polímeros de un vector viral, tales estructuras pueden interferir con la asociación estrecha entre la envoltura de la partícula del vector y los polímeros. Las proteínas de envoltura viral también tienen una carga dependiente del pH, que puede limitar o interferir con la asociación de polímeros, particularmente polímeros cargados. Además, los vectores virales empaquetados que albergan proteínas pseudotipificadas pueden sufrir desestabilización y destrucción 55 del recubrimiento *in vitro* e *in vivo*, liberando de este modo un vector viral capaz de transducir células de manera inespecífica, lo que potencialmente conduce a una reducción en el perfil de seguridad.

60 A diferencia de los vectores pseudotipados, los vectores que carecen de proteínas de envoltura pueden potenciar el empaquetamiento de los vectores virales utilizando polímeros. Los vectores recubiertos que carecen de proteína de envoltura muestran un perfil de seguridad mejorado en comparación con los vectores que tienen proteína de envoltura, porque después de la desestabilización o destrucción del recubrimiento, no pueden transducir células *in vitro* o *in vivo*. Las nanopartículas de la presente tecnología en las que el vector viral carece de proteína de envoltura viral tienen un 65 mecanismo de seguridad incorporado para su uso en terapia génica o inmunoterapia, porque las nanopartículas solo son capaces de transducir una célula de mamífero por encima de un número umbral de moléculas de polímero por vector. Por debajo de ese número umbral de moléculas de polímero por vector, la cantidad de polímero es insuficiente

para recubrir completamente el vector, lo que puede hacer que las nanopartículas se vuelvan estructuralmente inestables o sujetas a la disociación de las moléculas de polímero de la nanopartícula. Una vez que tales vectores que carecen de proteína de envoltura pierden un recubrimiento de polímero eficaz, se vuelven incapaces de transducir células de mamífero, incluidas las células humanas. Tales nanopartículas tienen un perfil de seguridad mejorado para su uso *in vivo* en comparación con un vector o un vector encapsulado en polímero que carece de la característica umbral.

En algunas realizaciones, algunas proteínas de membrana, tales como proteínas que no son proteínas de envoltura o de fusión viral y que no forman de otro modo estructuras similares a espinas en la superficie exterior de la membrana, tales como proteínas de las células productoras del vector no utilizadas para la pseudotipificación, pueden estar presentes en la membrana lipídica de la partícula del vector viral. En determinadas realizaciones de la presente tecnología, las proteínas de envoltura viral están excluidas de las partículas del vector viral, tales como aquellas que tienen una masa significativa que sobresale de la superficie exterior de la bicapa lipídica de la envoltura, tal como al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 % o al menos el 50 % de su masa que sobresale de la superficie exterior de la envoltura.

Las composiciones de nanopartículas pueden contener opcionalmente componentes adicionales, tales como moléculas lipídicas, surfactantes, ácidos nucleicos, moléculas proteicas o fármacos de moléculas pequeñas. La presente tecnología también contempla formulaciones o composiciones farmacéuticas que contienen las nanopartículas junto con uno o más excipientes, portadores, soluciones reguladoras, sales o líquidos, lo que hace que el vehículo de administración sea adecuado para la administración por vía oral, intranasal o parenteral, tal como al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 % o al menos el 50 % de su masa que sobresale de la superficie exterior de la envoltura.

La nanopartícula de vector viral de la presente tecnología puede servir como vehículo de administración de genes. La nanopartícula incluye un vector viral recubierto en su superficie exterior con una capa que contiene un polímero o una mezcla de polímeros. En determinadas realizaciones, el vector retroviral carece específicamente de la proteína de envoltura viral que podría incluirse por lo general en la envoltura de vectores retrovirales similares. En determinadas realizaciones, el vector viral carece específicamente de cualquier proteína de envoltura de vector viral de origen natural o modificada, tal como VSV-G de tipo salvaje o modificada, HIV gp120, HIV gp41, MMTV gp52, MMTV gp36, MLV gp71, sincitina, proteína de envoltura del virus Sindbis de tipo salvaje o modificada, glicoproteínas de hemaglutinina (H) y de fusión (F) del virus del sarampión y HEMO. En otras realizaciones, el vector contiene una o más de tales proteínas de envoltura.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un método de fabricación de la nanopartícula/vehículo de administración de genes descrito anteriormente (nanopartícula de vector viral). El método incluye las etapas de: (a) proporcionar un vector viral que carece de proteína de envoltura y que contiene un transgén; (b) proporcionar un polímero o una mezcla de polímeros; y (c) poner en contacto el vector viral y el polímero o la mezcla de polímeros, con lo que el vector viral y el polímero o la mezcla de polímeros se combinan para formar la nanopartícula, que contiene el vector viral recubierto con el polímero o la mezcla de polímeros.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona la nanopartícula según el primer aspecto de la presente invención para su uso en un método para tratar una enfermedad, comprendiendo el método administrar una composición que comprende una pluralidad de dichas nanopartículas a un sujeto que la necesita, mediante lo cual las células del sujeto son transducidas por el vector retroviral y el transgén se expresa en las células transducidas. En una realización, la enfermedad que se va a tratar es el cáncer. Para la administración *in vivo*, se prefieren las realizaciones en las que las proteínas de la envoltura viral, tales como VSV-G, están ausentes, ya que proporcionan un perfil de seguridad potenciado porque carecen de la capacidad de transducir células no diana en el hospedador y debido a un direccionamiento más específico proporcionado por el uso de encapsulación de polímero para restaurar la captación celular y/o la captación endosómica y/o el escape endosómico proporcionado de otro modo por la proteína de envoltura.

En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona un método para transducir células *in vitro*. El método incluye poner en contacto células cultivadas con una pluralidad de nanopartículas según el primer aspecto de la invención, con lo que al menos algunas de las células cultivadas son transducidas por el vector retroviral y el transgén se expresa específicamente en las células transducidas. En algunas realizaciones, las nanopartículas están dirigidas a células CD3-positivas y el transgén se expresa específicamente en células CD3-positivas, o el transgén codifica un receptor de antígeno químico.

En un quinto aspecto, la presente invención proporciona la nanopartícula del primer aspecto de la presente invención para su uso en un método para realizar una terapia génica, comprendiendo el método poner en contacto células *in vitro* o dentro de un organismo vivo con una pluralidad de dichas nanopartículas, con lo que el transgén se expresa en las células. El transgén puede reemplazar o modificar un gen deficiente o reemplazar un gen faltante.

La presente tecnología de invención se describe con más detalle en las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1A muestra un diagrama esquemático de una realización de una nanopartícula para administración de genes. La nanopartícula contiene una partícula de vector viral encapsulada en polímero que carece de proteína de envoltura. La figura 1B muestra un diagrama esquemático de una nanopartícula no según la invención para administración de genes, en la que el vector viral tiene proteínas de envoltura.

5 La figura 2 muestra un diagrama esquemático de una realización de una nanopartícula para la administración de genes, en la que el vector viral está encapsulado en múltiples capas de polímero. Las proteínas de la envoltura del vector viral, aunque no se muestran, pueden estar presentes en algunas realizaciones.

10 La figura 3 muestra un diagrama esquemático de una realización de una nanopartícula para administración de genes, en la que la nanopartícula incluye una unidad estructural de direccionamiento unida a la capa de polímero (o capa de polímero externa si se utiliza una multicapa de polímero).

15 Las figuras 4A-4C son representaciones esquemáticas de un procedimiento de transducción de una célula con un vector lentiviral que contiene un transgén GFP (Figura 4A), inhibiendo la transducción utilizando un anticuerpo anti-VSV-G (Figura 4B) y previniendo la inhibición mediada por anticuerpos mediante encapsulación de polímero de las partículas del vector (Figura 4C).

Las figuras 5A-5C son representaciones esquemáticas de un procedimiento similar al representado en las figuras 4A-4C, pero utilizando un vector lentiviral que carece de la proteína VSV-G.

Las figuras 6A-6F muestran los resultados de las mediciones del potencial zeta en vectores lentivirales bald encapsulados con los polímeros PBAE indicados.

20 La figura 7 muestra los resultados de la transducción de células HEK293T con un vector lentiviral que contiene un transgén GFP en función del tiempo de incubación en soluciones reguladoras de formulación que varían en composición y pH.

25 Las figuras 8A-8H muestran la estabilidad física de un vector lentiviral que carece de la proteína VSV-G en función de la p24 libre liberada después de tiempos de incubación crecientes (horas) en las soluciones reguladoras de formulación indicadas que varían en composición y pH. Las figuras 8A-8D muestran la p24 asociada al LV, y las figuras 8E-8H muestran la p24 libre liberada del LV.

La figura 9 muestra los resultados de la transducción de células HEK293T con un vector lentiviral que carece de proteína VSV-G y que contiene un transgén GFP en función de la proporción polímero R/partícula del vector, la composición de la solución reguladora de formulación y el pH.

30 La figura 10 muestra los resultados de un experimento similar al que se muestra en la figura 9 pero utilizando una mezcla de polímeros R/H en la que ambos polímeros estaban o no conjugados con colesterol.

La figura 11 muestra los resultados de un experimento similar al que se muestra en la figura 9 pero utilizando un vector lentiviral pseudotipado que contiene un transgén GFP.

35 La figura 12 muestra los resultados de la expresión de GFP y la viabilidad celular después de la transducción utilizando lentivectores VSV-G+ encapsulados utilizando los polímeros PBAE indicados y las proporciones de moléculas de polímero/célula, con y sin anticuerpo VSV-G. Los datos están normalizados, con una transducción en ausencia del anticuerpo igual al 100 %.

40 Las figuras 13A - 13D muestran los resultados de la expresión de mCherry y la viabilidad celular después de la transducción utilizando lentivectores VSV-G- (bald) encapsulados utilizando los polímeros PBAE y las proporciones de moléculas de polímero/célula indicadas.

45 Las figuras 14A - 14F muestran los resultados de la transducción de linfocitos humanos no encapsulados con vectores lentivirales VSV-G⁺ (14A), LV bald no encapsulado (14B), LV bald encapsulado con PBAE (14C) y LV bald encapsulado con PBAE con la unidad estructural de diana modelo PGA-anti-CD3 Fab (14D), todos analizados por clasificación celular activada por fluorescencia (comparando el etiquetado de anticuerpos CD3 y la expresión de GFP). En la figura 14E, los linfocitos también habían sido transducidos con un CAR específico para CD19, y las células que expresan CD3 se grafican contra la expresión de CAR CD19. En la figura 14F, los mismos linfocitos que se usaron para el experimento representado en la figura 9E se pusieron en contacto con células cancerosas humanas CD19+ (células Ramos) y se evaluó la citotoxicidad contra las células cancerosas por la pérdida de células CD19+ después de 4 horas.

50 La figura 15 muestra los resultados de la transducción (expresión de GFP) en diferentes poblaciones de PBMC de ratón después del tratamiento con cada uno de los vectores y títulos indicados.

Descripción detallada

5 Se proporcionan composiciones de nanopartículas de vector viral empaquetadas que permiten una administración potenciada de material genético para aplicaciones de terapia génica y vacunas. Estas composiciones incluyen un vector viral encapsulado por polímero o una mezcla de polímeros. La cubierta de polímero proporciona protección a la partícula de vector viral en el torrente sanguíneo y los tejidos después de la administración parenteral a un sujeto y, en algunas realizaciones, puede ayudar a administrar el vector a su célula diana.

10 La figura 1A muestra una nanopartícula de vector viral, también denominada en el presente documento como vehículo de administración de genes, según la presente tecnología. La figura 1B muestra una nanopartícula de vector viral, también denominada en el presente documento como vehículo de administración de genes, no según la presente tecnología. La estructura básica del vehículo es la de la nanopartícula 10, que contiene un vector retroviral encapsulado por una cubierta 11 de polímero. El vector retroviral incluye una envoltura 12 de membrana, una cápside 13 de proteína dispuesta dentro de la envoltura y una o más moléculas 14 de ácido nucleico dispuestas dentro de la cápside. La envoltura viral es una estructura basada en una bicapa lipídica que, en la nanopartícula de vector viral que se muestra en la figura 1B, contiene uno o más tipos de envoltura viral o proteínas 20 de fusión incrustadas dentro o unidas a la membrana de bicapa; dichas proteínas de envoltura o de fusión faltan en la nanopartícula de vector viral representada en la figura 1A. La envoltura del vector viral, con o sin proteínas de envoltura, está encapsulada, tanto funcional como esencialmente en su totalidad, por la matriz 11 polimérica. La partícula del vector puede estar encapsulada por más de una cubierta de polímero (véase, por ejemplo, la figura 2), es decir, puede estar encapsulada por una cubierta de polímero multicapa. La figura 3 muestra una realización en la que la unidad estructural 40 de direccionamiento está asociada con la cubierta de polímero.

15 20 En algunas realizaciones, la presente tecnología proporciona una nueva generación de vectores virales sintéticos, particularmente vectores lentivirales, en los que las partículas de vector viral carecen de una proteína de envoltura viral. Esta nueva tecnología de plataforma confiere varias ventajas en comparación con el uso de partículas de vector viral que contienen una proteína de envoltura, incluida la producción más barata de partículas de vector viral mediante transfección transitoria. 1) Debido a la eliminación del plásmido que codifica la proteína de envoltura viral y debido al hecho de que el vector no está transducido las células productoras durante la producción, la supresión de la proteína de envoltura aumenta el tiempo de producción útil, por lo que aumenta el rendimiento de los vectores producidos, 2) Los vectores que carecen de proteína de envoltura son más seguros para su uso en terapia génica *in vivo*, porque los vectores sin recubrimiento, que carecen de una proteína de envoltura viral, no pueden transducir células y porque tienen una inmunogenicidad reducida, 3) Los vectores que carecen de proteína de envoltura proporcionan una mayor 25 30 precisión y eficiencia de transducción debido al uso de un direccionamiento mediado por polímeros específicos. 4) Los vectores virales encapsulados en polímeros, particularmente los vectores lentivirales, son más estables a pH bajo que los vectores virales ordinarios (sin recubrimiento), lo que mejora su estabilidad y eficacia en el uso, especialmente cuando están involucrados los mecanismos de captación endosómica. La eliminación de la proteína de envoltura viral de las partículas del vector viral es especialmente compatible con el uso de partículas del vector viral recubiertas de 35 40 polímeros, porque esencialmente elimina la capacidad de las partículas del vector sin recubrimiento para transducir células, y el recubrimiento de polímero puede proporcionar un direccionamiento específico; de este modo, el riesgo de transducir células no diana se reduce drásticamente. Además, la eliminación de la proteína de envoltura viral promueve la asociación estrecha de las moléculas de polímero con la superficie de la envoltura del vector, lo que proporciona una mejor estabilidad y un direccionamiento más confiable en comparación con las partículas del vector viral recubiertas de polímero que contienen proteínas de la envoltura viral.

45 50 Para producir la forma nanoparticulada del vector, las moléculas de polímero deben estar fuertemente adheridas a las partículas del vector. La asociación débil de las moléculas de polímero con el vector puede conducir a la delaminación y pérdida de la cubierta de polímero de la superficie de las partículas del vector viral, con la consiguiente pérdida de actividad. Los vectores virales basados en retrovirus poseen por lo general una estructura central o cápside, que contiene un transgén y otras secuencias de ácidos nucleicos necesarias, y la estructura central está a su vez rodeada por una envoltura de membrana. La envoltura por lo general contiene una proteína de fusión viral que ayuda en la unión y fusión de la envoltura viral con la membrana de la célula hospedadora, permitiendo la entrada celular del vector viral. Sin embargo, en la realización de la presente tecnología, el papel del direccionamiento, unión y entrada celular es asumido (y restaurado en el caso de LV bald) por la cubierta de polímero de las partículas del vector nanoparticulado, que puede actuar a nivel de captación celular y/o endosómico para transducir células, haciendo innecesaria la proteína de fusión viral. Además, la presencia de una proteína de fusión viral en la envoltura del vector interfiere con la unión firme y estable de las moléculas de polímero a la envoltura. Por lo tanto, en determinadas realizaciones de la presente tecnología, las nanopartículas del vector viral se han diseñado para que carezcan de proteínas de envoltura, en particular para que carezcan de proteínas de fusión viral o de "espiga". El resultado es una 55 estructura de nanopartícula más robusta y un vector más estable que presenta una mejor actividad y una semivida más prolongada cuando se administra a un paciente, tal como por ejemplo mediante administración intravenosa.

Nanopartículas de polí(beta-amino éster)

60 En la tecnología actual, que un vector viral "carezca de proteína de envoltura" significa que la envoltura, en particular la bicapa lipídica, de la envoltura del vector está desprovista de cualquier proteína que se encuentre por lo general en la superficie de los virus con envoltura, ya sea en su forma natural o modificada, tal como el complejo proteico Env o las glicoproteínas de la envoltura viral exemplificadas por el complejo gp120-gp41 del HIV, la glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G), la hemaglutinina del virus de la gripe, las proteínas H y F del virus del sarampión y la

5 proteína de envoltura del virus Sindbis de tipo salvaje o modificado. Tales proteínas, de las que carecen las nanopartículas del vector de la tecnología actual, si estuvieran presentes, se proyectarían hacia afuera desde la bicapa lipídica de la envoltura del vector e interferirían con el contacto estable requerido entre la capa de polímero externa y la bicapa lipídica. En diferentes realizaciones, las nanopartículas de vector viral de la presente tecnología pueden i) 10 carecer completamente de proteínas de envoltura, ii) carecer esencialmente de proteínas de envoltura (es decir, contener solo una cantidad mínima, tal como 0.1 % o menos de partículas de vector viral típicas), o iii) tener una pequeña cantidad de proteína de envoltura, tal como menos del 10 %, menos del 5 %, menos del 3 %, menos del 2 % o menos del 1 % de la cantidad típica. Una cantidad típica de proteína de envoltura es una cantidad presente en una 15 partícula de vector viral que depende de la proteína de envoltura para la entrada y transducción celular, o una cantidad que se encuentra en la envoltura de una partícula de virus funcional intacta. La envoltura del vector viral se puede diseñar para que carezca completamente de proteína de envoltura, por ejemplo, eliminando cualquier gen que codifique una proteína de envoltura durante la expresión en las células a partir de las cuales se produce el vector. Sin embargo, las proteínas incrustadas en la membrana o unidas a la membrana que no forman estructuras similares a espigas en la superficie externa de la envoltura pueden estar presentes en la bicapa lipídica de las nanopartículas de vector viral en determinadas realizaciones.

En una realización, los polímeros utilizados para formar la nanopartícula del vector viral incluyen una o más especies de poli(beta-aminoéster) (PBAE) que tienen la fórmula



20 en la que Pep es un oligopéptido y R es OH, CH₃ o colesterol, una molécula de fosfolípido o un ácido graso o cadena de acilo, en la que m varía preferiblemente desde 1 a 20, n varía preferiblemente desde 1 a 100, y o varía desde 1 a 10. También se pueden utilizar otros polímeros y mezclas de los mismos entre sí y con PBAE para encapsular 25 partículas de vector viral. También se pueden utilizar otros mecanismos de recubrimiento que utilizan lípidos, tales como en forma de liposomas lipídicos unilamelares o multilamelares o estructuras similares a micelas que incluyen surfactantes y/o moléculas lipídicas. Tales recubrimientos pueden ser especialmente útiles para encapsular partículas de vector viral que carecen de proteínas de envoltura (vectores "bald").

30 Los PBAE se han descrito como vectores de administración de polinucleótidos no virales capaces de condensar tanto ADN como ARN en nanopartículas discretas (Green, J.J. et al. Acc. Chem. Res. 41, 749-759 (2008)), aunque muestran una baja eficiencia de transducción y una alta toxicidad. Los PBAE se pueden formar a partir de la reacción de monómeros de di(éster de acrilato) con monómeros de amina, lo que da como resultado polímeros que tienen grupos 35 acrilato terminales que se pueden funcionalizar con modificaciones en los extremos. Los grupos terminales son funcionalidades o unidades constitucionales que se encuentran en un extremo de una macromolécula u oligómero. La modificación de los extremos de los PBAE permite la mejora de sus propiedades biológicas.

40 La modificación química en los extremos de los PBAE con aminas primarias, por ejemplo, produce una mayor eficacia de transfección que los polímeros con terminación en acrilato. Alternativamente, los PBAE pueden modificarse en los 45 extremos con oligopéptidos, que pueden dirigir el vector a tipos de células particulares, dependiendo de la secuencia de oligopéptidos específica. Un "oligopéptido" como se define aquí comprende una cadena de al menos dos, o en algunas realizaciones al menos tres, aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos. Se describen ejemplos de PBAE modificados adecuadamente en los documentos WO2014/136100 y WO2016/116887.

45 En algunas realizaciones, el péptido oligopeptídico comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco o más aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en arginina (R), ácido glutámico (E), lisina (K), ácido aspártico (D), histidina (H) y cisteína (C). En algunas realizaciones, el oligopéptido contiene uno, dos, tres o más aminoácidos que están cargados positivamente (tales como R, K o H), o al menos parcialmente cargados positivamente, en condiciones fisiológicas. En otras realizaciones, el oligopéptido contiene uno o más aminoácidos cargados negativamente (tales como D o E), ya sea en ausencia de aminoácidos cargados positivamente o mezclados con aminoácidos cargados positivamente. Los 50 datos mostrados en los ejemplos revelan que la inclusión de aminoácidos cargados negativamente mejora el rendimiento de los vectores lentivirales bald, probablemente al mejorar el escape endosómico. Los oligopéptidos en cada extremo del polímero o los polímeros que comprenden la mezcla de polímeros son preferiblemente idénticos.

La nanopartícula PBAE garantiza que el vector permanezca intacto durante su tránsito mediante la circulación del paciente. La nanopartícula puede ayudar a proteger el vector viral del sistema inmunitario del hospedador, por ejemplo, asegurando que las nanopartículas reivindicadas puedan mantener una alta eficiencia de transducción incluso en presencia de anticuerpos neutralizantes de la envoltura antiviral. Además, la partícula puede garantizar que el vector transfecte solo las células inmunitarias deseadas: las modificaciones de la nanopartícula y/o la presencia de unidades estructurales de direccionamiento pueden dirigir la nanopartícula específicamente a los tejidos de interés.

Preferiblemente, los PBAE empleados en la presente tecnología tienen un peso molecular desde 1,000 a 100,000 g/mol, más preferiblemente desde 2,000 a 50,000 g/mol, y aún más preferiblemente desde 5,000 a 40,000 g/mol.

La capa o cubierta de polímero que recubre la envoltura del vector viral puede formar una única capa de polímero homogénea, o puede formar dos o más capas superpuestas del mismo polímero o de polímeros diferentes, o de polímeros que tengan diferente carga neta o grado de reticulación. Se pueden mezclar otros polímeros que no sean PBAE con PBAE o agregarlos por encima o por debajo de una capa de PBAE para formar la cubierta de polímero.

La carga superficial (o potencial superficial o potencial zeta) de las nanopartículas es importante para el direccionamiento tisular y la transducción celular y se puede ajustar con precisión mediante modificaciones de polímeros. Preferiblemente, el potencial zeta de las nanopartículas en condiciones fisiológicas de uso está en el intervalo desde aproximadamente -30 mV a aproximadamente +30 mV, o más preferiblemente en el intervalo desde aproximadamente -15 mV a aproximadamente +15 mV. La nanopartícula polimérica puede incluir un tipo de polímero o más de un tipo de polímero. En algunas realizaciones, el recubrimiento de polímero forma un recubrimiento de una sola capa, un recubrimiento de doble capa o un recubrimiento multicapa. La figura 2 muestra una realización de la nanopartícula de vector que incluye una primera capa 30, una segunda capa 31 y una tercera capa 32 de diferentes recubrimientos poliméricos que encapsulan el vector retroviral. En algunas realizaciones, el recubrimiento multicapa incluye un polímero aniónico y un polímero catiónico. En algunas realizaciones, el polímero catiónico incluye uno o más PBAE. En algunas realizaciones, el polímero aniónico es ácido poliglutámico (PGA), sulfato de condroitina y/o ácido hialurónico. En determinadas realizaciones, el vector viral está encapsulado dentro de dos o más capas de polímeros, tales como capas alternas que tienen cargas eléctricas netas alternas, es decir, una capa con carga positiva es seguida por una capa con carga negativa y luego por una capa con carga positiva. En algunas realizaciones, la carga neta de la nanopartícula es positiva a pH 7. En algunas realizaciones, la carga neta de la nanopartícula es negativa a pH 7. En algunas realizaciones, la carga neta de la nanopartícula depende del tejido. En algunas realizaciones, la partícula tiene carga negativa, pero en el microambiente del tumor se carga positivamente. En algunas realizaciones, la partícula responde al microambiente tumoral débilmente ácido y al endo/lisosoma a través de la desintegración o escisión de determinados enlaces químicos, por lo que la capa de PBAE que se encuentra debajo queda expuesta y ejerce un efecto de "esponja de protones".

Como se utiliza en el presente documento, el término "nanopartículas" se refiere a una partícula sólida con un diámetro desde aproximadamente 1 a aproximadamente 1000 nm. El diámetro medio de las nanopartículas de la presente tecnología se puede determinar mediante métodos conocidos en la técnica, preferiblemente mediante dispersión de luz dinámica. En particular, la tecnología se relaciona con nanopartículas que son partículas sólidas con un diámetro desde aproximadamente 1 a aproximadamente 1000 nm cuando se analizan mediante dispersión de luz dinámica a un ángulo de dispersión de 90° y a una temperatura de 25 °C, utilizando una muestra diluida adecuadamente con PBS filtrado y un instrumento adecuado, tal como uno de los instrumentos ZETASIZER de Malvern Instruments (Reino Unido). Cuando se dice que una partícula tiene un diámetro de x nm, generalmente habrá una distribución de partículas alrededor de esta media, pero al menos el 50 % en número (por ejemplo, >60 %, >70 %, >80 %, >90 % o más) de las partículas tendrán un diámetro dentro del intervalo $x \pm 20\%$.

El diámetro de la nanopartícula puede ser desde aproximadamente 5 nm a aproximadamente 999 nm, y preferiblemente es desde aproximadamente 50 nm a aproximadamente 400 nm, más preferiblemente desde aproximadamente 100 nm a aproximadamente 300 nm. Alternativamente, el diámetro de la nanopartícula puede ser desde aproximadamente 10 a aproximadamente 100 nm. En una realización, las nanopartículas presentan un grado de aglomeración de menos del 10 %, preferiblemente menos del 5 % y preferiblemente menos del 1 %. Preferiblemente, las nanopartículas son sustancialmente no aglomeradas, según se determina mediante microscopía electrónica de transmisión u otro método.

Vectores retrovirales

Los retrovirus son virus de ARN que poseen la capacidad de integrarse en el genoma del hospedador de una manera estable. En realizaciones preferidas, el vector retroviral en el vehículo de administración de genes es un vector lentiviral. Los vectores lentivirales se derivan de lentivirus, que representan un género de virus lentos de la familia Retroviridae. Los lentivirus incluyen virus de inmunodeficiencia humana (HIV), virus de inmunodeficiencia de simios (SIV), virus de encefalitis infecciosa equina (EIAV), virus de artritis encefalitis caprina (CAEV), virus de inmunodeficiencia bovina (BIV) y virus de inmunodeficiencia felina (FIV). Los lentivirus pueden integrarse en el genoma de células en división y células que no se dividen. Además, pueden persistir indefinidamente en sus hospedadores y replicarse continuamente. En algunas realizaciones descritas en el presente documento, el vector lentiviral tiene una cápside pero carece de proteína de envoltura. Preferiblemente, el vector no es replicativo en células del hospedador o sujeto de tratamiento previsto. Preferiblemente, el vector no transduce ni altera la expresión génica de células no dirigidas. Preferiblemente, el vector carece de genes que causen virulencia, en particular virulencia que se manifiesta como la inducción de la muerte celular no intencionada de células no dirigidas.

Los vectores lentivirales presentan varias ventajas como herramientas para la inmunoterapia. Son menos tóxicos en comparación con otros vectores y son capaces de transducir células que no se dividen, incluidas las células dendríticas (He et al. 2007, Expert Rev Vaccines, 6(6):913-24). Sin embargo, los lentivirus son más complejos que otros retrovirus

debido a la presencia de genes accesorios (por ejemplo, vif, vpr, vpu, nef, tat y rev), que son necesarios para la replicación *in vivo*.

La bioproducción de vectores lentivirales integrativos pero con replicación defectuosa se basa en la separación de las secuencias que actúan en *cis* y *trans* del lentivirus. La transducción en células que no se dividen requiere la presencia de dos secuencias que actúan en *cis* en el genoma lentiviral, el trácto central de polipurina (cPPT) y la secuencia central de terminación (CTS). Esto conduce a la formación de un "colgajo" de ADN de triple cadena, que maximiza la eficiencia de la importación de genes a los núcleos de las células que no se dividen, incluidas las células dendríticas (DC) (Zennou et al., 2000, Cell, 101(2) 173-85; Arhel et al., 2007, EMBO J, 26(12):3025-25 37). Además, la eliminación de la secuencia LTR U3 ha dado como resultado vectores "autoinactivantes" que están completamente desprovistos de secuencias promotoras y potenciadoras virales y son más seguros.

Las partículas lentivirales, que contienen vectores lentivirales, pueden producirse mediante transfección transitoria de células HEK 293 (con o sin el antígeno T, adherentes o cultivadas en suspensión) utilizando una combinación de plásmidos de ADN, por ejemplo: (i) un plásmido de empaquetamiento que expresa Gag, Pol, Rev, Tat y, opcionalmente, proteínas estructurales o enzimas necesarias para el empaquetamiento del constructo de transferencia; (ii) un plásmido de transferencia proviral que contiene un casete de expresión y factores de acción *cis* del HIV necesarios para el empaquetamiento, la transcripción inversa y la integración; y (iii) un plásmido que codifica una proteína de envoltura, tal como la glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G), una proteína que permite la formación de partículas mixtas (pseudotipos) que pueden transducir una amplia variedad de células, especialmente células presentadoras de antígeno (APC), incluidas las células dendríticas (DC) y los macrófagos. En la presente tecnología, el plásmido que codifica una proteína de envoltura se omite por completo en determinadas realizaciones, mientras que en otras realizaciones se incluye pero su expresión se mantiene a un nivel bajo. Los vectores de partículas lentivirales también se pueden producir de forma continua insertando de forma estable los genes de empaquetamiento y el ADN codificante proviral en el genoma celular. También se puede utilizar una combinación de plásmidos integrados y transfección transitoria. Sin embargo, debe observarse que, en determinadas realizaciones, los vectores lentivirales adecuados para su uso en el vehículo de administración de genes descrito en el presente documento carecen de proteína de envoltura.

También se pueden utilizar vectores lentivirales no integradores que carecen de la proteína de envoltura en los vehículos de transferencia génica. Se encuentran ejemplos de vectores lentivirales no integradores en Coutant et al., PLOS ONE 7(11):e48644 (2102); Karwacz et al., J. Virol. 83(7):3094-3103 (2009); Negri et al., Molecular Therapy 15(9):1716-1723 (2007); y Hu et al., Vaccine 28:6675-6683 (2010).

Como el 5'LTR de la secuencia proviral está desprovisto de U3, la expresión del transgén está impulsada por un promotor interno. Los promotores virales, tales como el promotor CMV, preferiblemente no se utilizan debido a la presencia de potentes potenciadores. Se pueden utilizar promotores ubicuos, tales como promotores para los genes humanos que codifican ubiquitina, PGK, β-actina, GAPDH, β-quinesina y similares. Alternativamente, se pueden utilizar promotores activos en células T y APC, tales como el promotor para genes MHC clase I humanos. En todos los casos, el promotor preferiblemente no contiene un potenciador. El promotor se selecciona preferiblemente de modo que logre un nivel terapéutico de expresión del transgén en las células diana. En algunas realizaciones, el promotor es específico para las células diana, es decir, permite un nivel de expresión terapéutica del transgén en las células diana, y preferiblemente permite un nivel más alto de expresión del transgén en células diana que en células no diana; En determinadas realizaciones, el promotor permite poca o ninguna expresión del transgén en células no diana.

Encapsulación de vectores virales mediante polímeros

Las tecnologías anteriores que utilizan vehículos encapsulados en polímeros para transfectar células han implicado plásmidos u otras moléculas de ácido nucleico que están recubiertas directamente con polímeros tales como PBAE. Algunas de estas tecnologías han logrado la transfección utilizando moléculas de ácido nucleico (US2016/0145348A1, Mangraviti et al. 2015, Anderson et al. 2004, WO2016/116887). Se ha informado de una estabilidad deficiente de los polímeros de PBAE a pH 7 (Lynn et al. 2000). Tales preparaciones pueden causar toxicidad celular, lo que da como resultado la muerte celular tras la exposición a plásmidos recubiertos con polímeros u otras moléculas de ácido nucleico. Por lo tanto, la dosis de vector encapsulado en PBAE administrada a las células *in vivo* o *in vitro* debe mantenerse al mínimo necesario para una transducción útil, a fin de evitar efectos tóxicos. Sin embargo, los vectores virales encapsulados en PBAE resisten ventajosamente la degradación a pH bajo.

Hasta donde saben los presentes inventores, no se ha logrado con anterioridad la encapsulación de polímeros de vectores virales tales como el LV. Los inventores han desarrollado métodos para la encapsulación de polímeros del LV y otros vectores virales que dan como resultado partículas de LV encapsuladas en polímeros estables con baja toxicidad y alta eficacia en la transducción de células. Los factores importantes para producir vectores encapsulados viables incluyen el tipo de polímero utilizado (por ejemplo, su carga y distribución de carga), la proporción de moléculas de polímero con respecto a la partícula del vector y el pH utilizado para la encapsulación. Se investigó el efecto de estos parámetros y se describe en los ejemplos 1 y 2 a continuación.

Utilizando polímeros PBAE y LV, la encapsulación exitosa, que da como resultado partículas capaces de transducir eficientemente las células objetivo, requiere aproximadamente de 10^8 a 10^{11} moléculas de polímero por partícula de

vector; proporciones más altas pueden producir toxicidad. Además, el pH óptimo para una encapsulación exitosa difiere dependiendo de si el LV contiene VSV-G⁺ o no (VSV-G⁻ o LV "bald"). Para el VSV-G⁺ LV, la encapsulación óptima con PBAE ocurre aproximadamente a pH 5, como lo indica el alto nivel de transducción resistente a anticuerpos VSV-G a pH 5, mientras que se produjo poca o ninguna encapsulación a valores de pH más altos. Por el contrario, para el VSV-G⁻ LV, la eficiencia óptima de encapsulación de PBAE ocurre en un intervalo de pH más amplio y más bajo, tal como aproximadamente 5.0, 5.5, 6.0 o 6.5, o 5.0-6.5, o 5.0-6.0, o 5.5-6.0, o 5.5-6.5, mientras que para el VSV-G⁻ LV, la eficiencia óptima de encapsulación de PBAE ocurre en un intervalo de pH más bajo, tal como aproximadamente 5.0, 5.5, 6.0 o 6.5, o 5.0-6.5, o 5.0-6.0, o 5.5-6.0, o 5.5-6.5. Véase el ejemplo 2. Finalmente, el pH óptimo para una encapsulación exitosa que no impacte la viabilidad de las células transducidas es el mismo si el LV contiene VSV-G⁺ o no, tal como 5.0 o 5.5.

Las nanopartículas se pueden formar mezclando una solución que comprende los materiales requeridos y luego incubando la solución. Por ejemplo, las nanopartículas se pueden formar mezclando una solución que comprende PBAE con una solución que comprende el vector viral, luego incubando la solución. En algunas realizaciones, la solución contiene un azúcar, tal como glucosa. En algunas realizaciones, la solución contiene 5 % de glucosa. En algunas realizaciones, la solución contiene una solución reguladora. En algunas realizaciones, la solución reguladora es acetato de sodio, y la concentración final de la solución reguladora de acetato de sodio es desde 2 a 50 mM, desde 10 a 30 mM, o aproximadamente 25 mM. En algunas realizaciones, la solución reguladora es solución reguladora Tris-HCl, y la concentración final de la solución reguladora Tris-HCl es desde 2 a 40 mM, desde 5 a 30 mM, o desde 15 a 25 mM. En algunas realizaciones, la solución se incuba durante al menos 5 minutos. En algunas realizaciones, la solución se incuba durante al menos 30 minutos. En algunas realizaciones, la solución se incuba durante la noche. La solución se puede incubar a entre 4 y 40 °C, o entre 17 y 25 °C; preferiblemente, la solución se incuba a 4 °C.

En algunas realizaciones, las nanopartículas se forman utilizando la deposición capa por capa de polímeros iónicos sobre partículas de retrovirus, formando de este modo vectores virales recubiertos en múltiples capas. En algunas realizaciones, una solución que contiene polímeros iónicos se pone en contacto con una solución que contiene partículas de vector viral. La proporción de polímero a partículas de vector viral puede estar en el intervalo desde aproximadamente 1:100 a aproximadamente 5:1 en peso. La proporción se puede variar de modo que se asegure que las nanopartículas contengan en promedio una única partícula de vector viral por nanopartícula recubierta de polímero. Por ejemplo, la proporción en peso de todos los polímeros a vector viral puede ser desde aproximadamente 1:100 a aproximadamente 1:1, o desde aproximadamente 1:50 a aproximadamente 1:1, o desde aproximadamente 1:20 a aproximadamente 1:1, o desde aproximadamente 1:10 a aproximadamente 2:1, o desde aproximadamente 1:1 a aproximadamente 5:1. En algunas realizaciones, se agregan uno o más polímeros a una suspensión de partículas de retrovirus en glucosa u otro azúcar compatible con la liofilización y la inyección directa después de la reconstitución en un ser humano u otro sujeto. En algunas realizaciones, se agregan polímeros cargados negativamente y cargados positivamente de forma secuencial para formar capas de polímero que tienen cargas alternas. En algunas realizaciones, los polímeros se agregan a intervalos de 30 min. En algunas realizaciones, hay cinco capas de polímeros. En algunas realizaciones, los vectores virales recubiertos con múltiples capas tienen una carga neta negativa a pH 7. En algunas realizaciones, los vectores virales recubiertos con múltiples capas tienen una carga neta positiva a pH 7. El número y la polaridad de las capas se pueden elegir de forma que se optimice la eficiencia de transducción de tipos de células particulares de interés.

Preferiblemente, las nanopartículas se forman a un pH en el que la carga superficial, el potencial superficial o el potencial zeta de la partícula del vector viral es opuesto al de uno o más polímeros que forman la cubierta de polímero alrededor de la partícula del vector viral. En algunas realizaciones, el pH es superior al del punto isoeléctrico de una o más proteínas de la envoltura retroviral, o de la envoltura en su totalidad. Por ejemplo, el pH puede ser igual o superior a aproximadamente 4.0, 4.5, 5.0, 5.4, 5.4, 5.5, 5.6, 5.8, 6.0, 6.2, 6.4, 6.5, 6.8 o 7.0. En algunas realizaciones, las nanopartículas se forman en una solución que tiene un pH de aproximadamente 5.

Unidades estructurales de direccionamiento

El vehículo de administración del vector de nanopartículas puede dirigirse a células o tejidos diana específicos que requieren terapia, o en los que se desea la expresión de proteínas por el vector. Otra realización de la unidad estructural de direccionamiento se muestra en la figura 3, en la que el vehículo de administración contiene unidades estructurales de direccionamiento unidas covalentemente o no covalentemente a la superficie del polímero. Las unidades estructurales de direccionamiento pueden dirigirse a células o clases de células específicas, ya sea *in vivo* o *in vitro*. Los ejemplos de unidades estructurales de direccionamiento incluyen proteínas (por ejemplo, anticuerpos, incluidos anticuerpos humanos, de ratón, de camélidos y de tiburón, anticuerpos de cadena simple, nanocuerpos, diacuerpos y fragmentos de anticuerpos que se unen a antígenos), péptidos, ácidos nucleicos tales como aptámeros u oligonucleótidos, o ligandos que se unen a receptores de la superficie celular o componentes de la matriz extracelular.

En una realización, el vehículo de administración se dirige en particular a las células T para la expresión de una o más proteínas terapéuticas, tales como proteínas de receptor de antígeno quimérico (CAR), con el fin de potenciar la eliminación de células (por ejemplo, células tumorales o células patógenas) a las que se une el receptor quimérico. En una realización preferida, las células diana para el vector son células T (como células T CD3+) o células NK. El direccionamiento se puede lograr utilizando uno o más aptámeros de ADN o anticuerpos que tienen especificidad para una proteína en la superficie de las células diana. El aptámero o anticuerpo sirve como una unidad estructural de

direcciónamiento cuando se integra en la nanopartícula y se expone en la superficie de la nanopartícula. Por ejemplo, la unidad estructural de direcciónamiento puede unirse específicamente a CD3 o CD8, o una combinación de CD3 y CD8. Alternativamente, o además de esto, la unidad estructural de direcciónamiento puede unirse específicamente a una proteína de superficie que se encuentra solo en células T vírgenes, tales como CD45RA, CCR7, CD62L, CD27, CD28, IL7-Ra o DC-SIGN. También se pueden utilizar combinaciones de estas unidades estructurales de direcciónamiento.

Sin embargo, el direcciónamiento no se limita a la tecnología CAR o a las células hematológicas. Se puede dirigir a cualquier tipo de célula. Por ejemplo, en determinadas aplicaciones de terapia génica, se puede dirigir a un tejido o tipo de célula específico (por ejemplo, células hematopoyéticas, miocitos, células de los islotes, etc.) según la necesidad de reparar o reemplazar una función defectuosa. En otras aplicaciones, se pueden dirigir a células quiescentes en lugar de células en división para reducir el riesgo de eventos de recombinación. En otras aplicaciones más, se pueden dirigir a células en división, tales como las células cancerosas, por ejemplo, en una vacuna contra el cáncer.

Transgenes y sus productos de expresión

El vector viral en el vehículo de administración de genes descrito en el presente documento contiene uno o más transgenes que, después de entrar en una célula, se expresan en la célula y producen productos de expresión. El vector viral puede contener uno, dos, tres o más transgenes. Los transgenes son moléculas de ácido nucleico que codifican cualquier proteína, polipéptido o péptido de origen natural o artificial (es decir, recombinante), incluida una proteína terapéutica o una proteína marcadora. Tales proteínas expresadas en el vector tienen preferiblemente un valor terapéutico en el sujeto en el que se expresan y, por lo tanto, son proteínas terapéuticas. Un tipo de proteína terapéutica es un receptor de antígeno químérico (CAR). Los CAR para su uso en la tecnología descrita en el presente documento son receptores de antígeno recombinantes, tales como receptores de células T, con especificidad de unión para antígenos de la superficie celular que no requieren procesamiento de péptidos o expresión de HLA para unirse. La porción de unión al antígeno puede ser un scFv derivado de un anticuerpo, de un Fab seleccionado de una biblioteca, o puede ser un ligando de origen natural para un receptor de la superficie celular. También puede ser un nanocuerpo (VHH). El resto de la molécula de CAR acopla el dominio de unión al antígeno a los dominios de transducción de señales intracelulares. Específicamente, un CAR de la tecnología incluye uno o más de cada uno de los siguientes dominios: un dominio de unión al antígeno extracelular, un dominio de bisagra y transmembrana, y dominios de señalización intracelular (CD3zeta y/o CD28 o 41-BB/OX40). En el documento WO2016/012623A1 se encuentran más detalles de los CAR adecuados para su uso en el vehículo de administración de genes y las secuencias para codificarlos en un vector lentiviral.

Otros genes que pueden administrarse utilizando los vehículos de administración de genes de la presente tecnología incluyen interleucinas y citocinas, tales como la interleucina 1 (IL-1), IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, GM-CSF y G-CSF. También pueden administrarse genes que codifican antígenos como antígenos virales, antígenos bacterianos, antígenos fúngicos o antígenos parásitarios. Los virus cuyos antígenos pueden expresarse incluyen picornavirus, coronavirus, togavirus, flavivirus, rhabdovirus, paramixovirus, ortomixovirus, bunyavirus, arenavirus, reovirus, retrovirus, papovavirus, parvovirus, herpesvirus, poxvirus, hepadnavirus y virus espongiformes. Los objetivos virales preferidos incluyen influenza, virus herpes simplex 1 y 2, sarampión, viruela, polio o HIV. Los patógenos incluyen tripanosomas, tenias, lombrices intestinales, helmintos. Los antígenos tumorales tales como antígeno fetal o antígeno prostático específico también pueden ser dirigidos de esta manera. La administración de un vector según la presente tecnología para propósitos de vacunación puede realizarse de acuerdo con cualquier estrategia de vacunación conocida. La vacunación de un individuo puede llevarse a cabo según cualquier programa deseado; preferiblemente la vacunación solo se requiere con poca frecuencia, tal como anualmente o bienalmente, y proporciona protección inmunológica a largo plazo contra el agente infeccioso.

Un transgén de vector viral también puede codificar una proteína antipunto de control. Ejemplos de proteínas antipunto de control que pueden ser codificadas por el transgén son inhibidores de CTLA-4, PD1, PDL1, LAG-3, TIM 3, B7-H3, ICOS, IDO, 4-1BB, CD47 y combinaciones de los mismos.

Usos de los vehículos de administración de genes

Los vehículos de administración de genes de la presente tecnología se pueden utilizar en cualquier aplicación que requiera una transducción eficaz de material genético en células de interés, tales como células de mamíferos o células humanas, mediante un vector retroviral, tal como un vector lentiviral. Los vehículos de administración transducen células con alta eficiencia y presentan baja toxicidad y baja inmunogenicidad. Pueden integrar permanentemente material genético en el genoma de la célula hospedadora, lo que hace que el sistema sea particularmente adecuado para el etiquetado permanente de células y su progenie. Dado que los vehículos presentan alta especificidad, baja toxicidad y alta capacidad de transducción incluso *in vivo*, son particularmente adecuados para aplicaciones de transferencia de genes y terapia génica tanto para terapia en humanos y animales, como también en modelos animales, permitiendo de este modo la investigación de los mecanismos moleculares subyacentes a diferentes funciones biológicas y su traducción en terapia. Sin embargo, algunas preparaciones de nanopartículas de vector viral encapsuladas en polímero pueden limitarse a la transducción de determinados tipos de células, tales como transducir preferentemente células en división y no transducir células que no se dividen.

Los vehículos de administración de la presente tecnología se pueden utilizar para diseñar genéticamente células para aplicaciones biotecnológicas, tales como la fabricación de productos biológicos y las mejoras de ganado y plantas. La inserción precisa y estable del gen o genes de interés es esencial para estas actividades, y se puede lograr de manera consistente con el vehículo de la tecnología. Los vehículos se pueden utilizar para insertar genes que no estaban originalmente presentes en células utilizadas para fines de fabricación, tales como células transformadas (células de ovario de hámster chino (CHO), células HEK293) o células primarias. Alternativamente, los vehículos se pueden utilizar para "desactivar" determinados genes presentes en esas células, tales como genes involucrados en la glucosilación de proteínas, una causa común de inmunogenicidad. Los vehículos se pueden utilizar, por ejemplo, para prevenir, tratar o curar enfermedades que afectan al ganado, o para mejorar su valor económico, acelerando el crecimiento y la maduración.

El vehículo de administración de genes se puede utilizar para administrar material genético como parte de una terapia génica *in vitro* o *in vivo*. El vehículo de administración de genes se puede emplear en terapia génica para reemplazar una versión mutada de un gen que causa una enfermedad con una copia sana del gen; inactivar o "desactivar" un gen que no funciona correctamente y/o introducir un nuevo gen en una célula, tal como para combatir una enfermedad. El uso de vectores retrovirales, en general, permite la inserción permanente de material genético en una célula de interés. El uso de vectores lentivirales, en particular, permite la inserción permanente de material genético incluso en células que no se dividen.

Los vehículos de administración de genes son capaces de transducir células *in vivo*, lo que conduce a la expresión funcional del transgén y, por lo tanto, se pueden utilizar para llevar a cabo una terapia génica. El vehículo de administración de vectores se puede administrar por vía parenteral, tal como por vía intravenosa, intramuscular o intratumoral. Alternativamente, el vehículo de administración de vectores se puede administrar por vía externa, tal como por vía oral o intranasal. El vehículo de administración de genes se puede administrar por cualquier otra vía adecuada, incluidas la intracerebral y la pulmonar.

Los vehículos de administración de genes de la presente tecnología también son capaces de transducir células *in vitro*, lo que conduce a la expresión funcional del transgén y, por lo tanto, se pueden utilizar para llevar a cabo una terapia génica *in vitro* y *ex vivo*. Las células del paciente se pueden obtener (por ejemplo, a través de una muestra de sangre o médula ósea, o una biopsia) y ponerlas en contacto con uno de los vehículos de administración de vectores descritos en un entorno de laboratorio. Las células transducidas se pueden devolver al paciente y ayudar a tratar una enfermedad.

Las enfermedades que pueden tratarse con terapia génica utilizando vehículos de administración de genes de la tecnología incluyen trastornos hereditarios, tales como inmunodeficiencia combinada grave (SCID), enfermedad granulomatosa crónica (CGD), síndrome de Wiskott-Aldrich (WAS), leucemia linfoblástica aguda recurrente (ALL), adrenoleucodistrofia (ALD), hemofilia B, deficiencia de adenosina deaminasa (ADA), fibrosis quística (CF), betatalasemia, enfermedad de células falciformes, distrofia muscular de Duchenne, hipercolesterolemia familiar y ceguera hereditaria. Las enfermedades tratables también incluyen trastornos neurodegenerativos, tales como la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Huntington. También incluyen enfermedades adquiridas tales como enfermedades cardíacas, diabetes, trastornos osteoarticulares y enfermedades infecciosas (por ejemplo, influenza, HIV, hepatitis, entre otras). Otras enfermedades tratables incluyen cáncer, tales como cánceres de próstata, páncreas, cerebro, piel, hígado, colon, mama y riñón.

40 **Ejemplo 1. Producción de vectores lentivirales recubiertos de polímero.**

Se elaboraron vectores lentivirales recubiertos de polímero para su uso en estudios de transducción celular utilizando los siguientes materiales y métodos.

Materiales

El plásmido vector de transferencia fue pARA-CMV-GFP o pARA-CMV-mCherry o pARA o pAra-hUBC-CD19.

Un plásmido resistente a la kanamicina codificado para el provirus (un ADN proviral recombinante no patógeno y no replicativo derivado del HIV-1, cepa NL4-3), en el que se clonó un casete de expresión. El inserto contenía el transgén, el promotor para la expresión del transgén y secuencias agregadas para aumentar la expresión del transgén y permitir que el vector lentiviral transdujera todos los tipos de células, incluidas las no mitóticas. Las secuencias codificantes correspondían al gen que codifica la proteína fluorescente verde (GFP) o mCherry (proteína fluorescente roja) o CD19. El promotor era el promotor de la ubiquitina humana o el promotor del CMV. Estaba desprovisto de cualquier secuencia potenciadora y promovía la expresión génica a un alto nivel de manera ubicua. Las secuencias no codificantes y las señales de expresión correspondieron a secuencias de repetición terminal larga (LTR) con todos los elementos cis-activos para el 5'LTR (U3-R-U5) y el suprimido para el 3'LTR, por lo que carecen de la región promotora (Δ U3-R-U5). Para los experimentos de transcripción e integración, se agregaron secuencias de encapsidación (SD y 5'Gag), el sitio central de terminación del tracto de polipurina para la translocación nuclear de los vectores y el sitio de poliadenilación de BGH.

El plásmido de empaquetamiento fue pARA-Pack. El plásmido resistente a la kanamicina codificó para las proteínas lentivirales estructurales (GAG, POL, TAT y REV) utilizadas en trans para la encapsidación del provirus lentiviral. Las

secuencias codificantes correspondieron a un gen policistrónico gag-pol-tat-rev, que codifica para las proteínas estructurales (Matriz MA, Cápside CA y Nucleocápside NC), enzimáticas (Proteasa PR, Integrasa IN y Transcriptasa Reversa RT) y reguladoras (TAT y REV). Las secuencias no codificantes y señales de expresión correspondieron a un promotor mínimo del CMV para la iniciación de la transcripción, una señal de poliadenilación del gen de la insulina para la terminación de la transcripción y un Elemento Responsivo a Rev del HIV-1 (RRE) que participa en la exportación nuclear del ARN de empaquetamiento.

El plásmido de envoltura, cuando se utilizó, fue pENV1. Este plásmido resistente a la kanamicina codificó la glicoproteína G de la cepa Indiana del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G), utilizada para la pseudotipificación de algunos de los vectores lentivirales. Los genes VSV-G se optimizaron con codones para su expresión en células humanas, y el gen se clonó en el plásmido pVAX1 (Invitrogen). Las secuencias codificantes correspondieron al gen VSV-G optimizado con codones, y las secuencias no codificantes y las señales de expresión correspondieron a un promotor mínimo del CMV para la iniciación de la transcripción y al sitio de poliadenilación de BGH para estabilizar el ARN.

Producción de partículas de vectores lentivirales VSV-G ("Bald")

Las células LV293 se sembraron a 5×10^5 células/mL en 2 matraces Erlenmeyer de 3000 mL (Corning, 431252) en 1000 mL de medio de producción LVmax (Gibco, A3583401). Los dos matraces Erlenmeyer se incubaron a 37 °C, 65 rpm bajo CO₂ humidificado al 8 %. El día después de la siembra, se realizó la transfección transitoria. El reactivo transfectante PEIPro (PolyPlus, 115-010) se mezcló con el plásmido del vector de transferencia (pARA-CMV-GFP o pARA-CMV-mCherry o pARA o pAra-hUBC-CD19) y el plásmido de empaquetamiento (pARA-Pack). Después de la incubación a temperatura ambiente, la mezcla PEIPro/plásmido se agregó gota a gota a la línea celular y se incubó a 37 °C, 65 rpm bajo CO₂ humidificado al 8 %. El día 3, la producción de lentivector se estimuló con butirato de sodio a una concentración final de 5 mM. La mezcla a granel se incubó a 37 °C, 65 rpm bajo CO₂ humidificado al 8 % durante 24 horas. Después de la clarificación por filtración profunda a 5 y 0.5 µm (Pall, 609-122U), la mezcla a granel clarificada se incubó 1 hora a temperatura ambiente para el tratamiento con DNasa.

La purificación del lentivector se realizó mediante cromatografía (membrana Q mustang) y se eluyó mediante gradiente de NaCl. La filtración de flujo tangencial se realizó en una membrana HYDROSORT de 100 kDa (Sartorius, 3M81446802E-SW), que permitió reducir el volumen y formular en una solución reguladora específica a pH 7, asegurando al menos 2 años de estabilidad. Después de la filtración estéril a 0.22 µm (Millipore, SLGVM33RS), el producto farmacéutico a granel se envasó en viales de vidrio de 2 ml con alícuotas inferiores a 1 mL, luego se etiquetó, se congeló y se almacenó a < -70 °C.

El número de LV bald se evaluó mediante cuantificación física del título. El ensayo se realizó mediante la detección y cuantificación de la proteína p24 del núcleo del HIV-1 asociada al lentivirus únicamente (kit de titulación de lentivirus P24 ELISA Cell Biolabs QUICK TITER).

Producción, purificación y cuantificación de polímero 5 PBAE

Los polímeros de poli(β-amino éster) se sintetizaron siguiendo un procedimiento de dos etapas similar al descrito por Dosta et al. 5-amino-1-pentanol (Sigma-Aldrich 3.9 g, 38 mmol) y 1-hexilamina (Sigma-Aldrich 3.9 g, 38 mmol) se mezclaron en un matraz de fondo redondo y se combinaron con diacrilato de 1,4-butanodiol (Aldrich 18 g, 82 mmol) en una proporción molar de 2.1:1 de monómeros de diacrilato a amina. La mezcla se calentó a 90 °C con agitación durante 20 h. Luego se enfrió a temperatura ambiente para formar un aceite sólido viscoso de color amarillo claro y se almacenó a -20 °C hasta su uso posterior.

Las estructuras sintetizadas se confirmaron mediante espectroscopia de ¹H RMN. Los espectros de RMN se registraron en un Varian de 400 MHz (Varian NMR Instruments, Claredon Hills, IL) y se utilizó metanol-d4 como disolvente. La determinación del peso molecular se realizó en un sistema HPLC Elite LaChrom (VWR-Hitachi) equipado con una columna GPC SHODEX KF-603 (6.0 x aproximadamente 150 mm) y THF como fase móvil. El peso molecular se calculó por comparación con los tiempos de retención de los estándares de poliestireno. El peso molecular promedio en peso (Mw) fue de 4400 y el peso molecular promedio en número (Mn) fue de 2900.

Los PBAE modificados con oligopéptidos se obtuvieron mediante la modificación de los extremos del polímero C6 con terminación en acrilato con un oligopéptido con terminación en tiol en una proporción molar de 1:2.5 en dimetilsulfóxido (DMSO). El siguiente procedimiento sintético para obtener el polímero PBAE modificado con triarginina, C6-CR3, se muestra como ejemplo: una solución de C6 (113 mg, 0.054 mmol) disuelta en DMSO (1.1 mL) y una solución de clorhidrato de H-Cys-Arg-Arg-NH₂ (CR3 95 % de pureza adquirida a Ontores) (99 mg, 0.13 mmol) en DMSO (1 mL) se mezclaron en un vial con tapa de rosca revestido de teflón y se agitaron en un baño de agua con una temperatura controlada de 20 °C durante 20 h. El polímero tapado se precipitó con 5 volúmenes de éter dietílico. Después de la centrifugación (10 min a 3000 g), el polímero se lavó con 2 volúmenes de mezcla fresca de éter dietílico y acetona (7:3 v/v), luego el residuo se secó al vacío antes de formar una solución de 100 mg/mL en DMSO, que se almacenó a -20 °C.

En un ejemplo adicional, el polímero PBAE modificado con tri-lisina en el extremo, C6-CK3, se obtuvo mezclando una solución de C6 (100 mg, 0.048 mmol) disuelto en DMSO (1.1 mL) y una solución de clorhidrato de H-Cys-Lys-Lys-Lys-NH₂ (CK3) (78 mg, 0.12 mmol) en DMSO (1.8 mL) y procesando la reacción de acoplamiento como se describió previamente para C6-CR3. Para el polímero PBAE modificado con tri-histidina en el extremo, C6-CH3, la solución de C6 (65 mg, 0.031 mmol) disuelto en DMSO (1.1 mL) que se mezcló con una solución de clorhidrato de H-Cys-His-His-His-NH₂ (CH3) (53 mg, 0.078 mmol) en DMSO (1.2 mL). El polímero PBAE modificado terminalmente con tri-aspartato, C6-CD3, la solución de C6 (96 mg, 0.046 mmol) disuelto en DMSO (1.1 mL) que se mezcló con una solución de clorhidrato de H-Cys-Asp-Asp-Asp-NH₂ (CD3) (96 mg, 0.046 mmol) en DMSO (1.7 mL). Finalmente, el polímero PBAE modificado terminalmente con tri-glutamato, C6-CE3, la solución de C6 (280 mg, 0.13 mmol) disuelto en DMSO (1.1 mL) que se mezcló con una solución de clorhidrato de H-Cys-Glu-Glu-Glu-NH₂ (CE3) (184 mg, 0.34 mmol) en DMSO (4.6 mL).

La estructura química de los PBAE modificados con oligopéptidos se confirmó mediante espectroscopia de RMN de ¹H por la desaparición de las señales de acrilato y la presencia de señales por lo general asociadas con unidades estructurales de aminoácidos. El contenido de péptidos libres residuales se cuantificó mediante detección UV (longitud de onda de 220 nm) después de la separación mediante el sistema UPLC ACQUITY (Waters) equipado con una columna BEH C18 (130 Å, 1.7 µm, 2.1x50 mm, temperatura de 35 °C) utilizando un gradiente de acetonitrilo.

Producción de Fab-PGA

El ácido poliglutámico (PGA) de 15 kDa (Alamanda Polymers) se disolvió en una solución reguladora MES a un pH de 6.0 a 20 mg·mL⁻¹ y luego se sonicó durante 10 min en un sonicador de baño. Se agregaron 1.8 mL de solución de PGA a 0.9 mL de etil-N-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida-HCl (4 mg·mL⁻¹, 16 equiv.) y 0.9 mL de sulfo-NHS (2.75 p/p de EDC) ambos en solución reguladora MES a un pH de 6.0 y la solución se mezcló a temperatura ambiente durante 15 min. El PGA activado resultante se agregó a una solución de fragmento F(ab')2 anti-CD3ε de ratón (InVivoMAb) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) en una proporción molar de 4:1 y se mezcló a temperatura ambiente durante 2 h. Se eliminaron los reactivos en exceso y el PGA no ligado, por filtración (columna Vivaspin de 30,000 MWCO) y la solución reguladora se intercambió 7 veces por PBS. La concentración de anticuerpos se determinó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

Cinética de estabilidad de VSV-G⁺ LV en función del pH

Se diluyeron 10 µL de Lentivectores de pseudotipificación de producto farmacéutico o lentivectores bald en 10 µL de diferentes soluciones reguladoras (pH 5 a 7) durante diferentes tiempos (0, 15, 30, 60, 90 y 120 minutos) a +4 °C.

La titulación de los lentivectores pseudotipificadores se realizó mediante citometría de flujo de la siguiente manera. Se sembraron células HEK293T (8×10^5 células/pocillo) en placas de 24 pocillos y se incubaron a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5 % de CO₂. Despues de 4 h, se retiró el medio de cultivo y se agregaron a cada pocillo 300 µL de DMEM fresco que contenía 10 % de FBS, 1 % de PS y 10 µL de cada condición. Despues de 2 h, cada pocillo se complementó con 0.5 mL de medio de cultivo fresco. Tres días despues de la infección, las células HEK293T de cada pocillo se trisnizaron, se fijaron (solución BD CellFix #340181) y se determinó el número de células con fluorescencia positiva mediante citometría de flujo (AttuneNXT; Invitrogen, Inc.).

Se utilizó la siguiente fórmula para convertir el porcentaje de células que expresan GFP para una dilución específica en TU:

TU/ml = (% de células que expresan eGFP/100) × número total de células HEK293T en el momento de la infección/volumen de stock de virus agregado (mL).

La titulación de los lentivectores bald se realizó mediante cuantificación física del título. El ensayo se realizó mediante la detección y cuantificación de la proteína p24 del núcleo del HIV-1 asociada al lentivirus únicamente (kit de titulación de lentivirus QUICK TITER P24 ELISA de Cell Biolabs). Una muestra de pretratamiento permite distinguir la p24 libre de los lentivectores destruidos.

Encapsulación de VSV-G⁺ LV y LV Bald con PBAE modificado con oligopéptidos

La encapsulación de los vectores lentivirales se realizó de la siguiente manera. Los vectores lentivirales se diluyeron en una solución reguladora de citrato 25 mM pH 5.0 (o en un sistema de solución reguladora apropiado a un pH definido diferente) para preparar un volumen final de 75 µL por réplica. Los polímeros de PBAE se diluyeron en la misma solución reguladora que para los vectores lentivirales (75 µL por réplica) y se agitaron durante 2 s para homogeneizar. Los polímeros diluidos se agregaron a los vectores diluidos en una proporción de 1:1 (v/v), las mezclas se agitaron suavemente con vórtex durante 10 s y se incubaron 30 minutos a +4 °C. Finalmente, se agregó un volumen igual de medio de cultivo (150 µL) a las reacciones de encapsulación antes de la transferencia a las células.

Recubrimiento de VSV-G⁺ LV encapsulado con PBAE y LV bald con PGA-Fab

El método de encapsulación descrito anteriormente se modificó de la siguiente manera. Los vectores lentivirales se diluyeron en una solución reguladora de citrato 25 mM pH 5.0 (o en un sistema de solución reguladora apropiado a un

pH definido) para preparar un volumen final de 75 μ L por réplica. Los PBAE se diluyeron en la misma solución reguladora que para los vectores lentivirales (75 μ L por réplica) y se agitaron en vórtex durante 2 s para homogeneización. Los polímeros diluidos se agregaron a los vectores diluidos en una proporción de 1:1 (v/v). Las mezclas se agitaron suavemente en vórtex durante 10 s y se incubaron 30 minutos a +4 °C. El polímero PGA-Fab diluido en una solución reguladora de citrato 25 mM pH 5.0 (o en un sistema de solución reguladora apropiado a un pH definido) se agregó a la mezcla de encapsulación y se agitó suavemente en vórtex durante 10 s para homogeneización. La mezcla de reacción de recubrimiento se incubó 30 minutos a +4 °C y el volumen se completó hasta 300 μ L con medio de cultivo antes de transferirlo a las células.

Ejemplo 2. Mediciones del potencial zeta de vectores lentivirales encapsulados en PBAE.

10 Las mediciones de carga superficial de partículas de los complejos LV/PBAE/PGA-Fab se determinaron mediante dispersión de luz dinámica (DLS) a temperatura ambiente con un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Reino Unido, láser de 4 mW) utilizando una longitud de onda de 633 nm. Las mediciones se llevaron a cabo mezclando 200 μ L de complejos con 800 μ L de solución reguladora D-PBS 1x (pH 7.1). Los resultados se graficaron como media y desviación estándar de 3 mediciones analizadas por intensidad, y se muestran en las figuras 6A-6F. Los resultados mostraron una modificación del potencial de superficie por la encapsulación de las partículas del vector con polímero de acuerdo con la carga del polímero, lo que indica una encapsulación exitosa con polímero.

Ejemplo 3. Transducción de células HEK293T mediante vectores lentivirales recubiertos de polímero.

20 Para probar el efecto del recubrimiento de polímero sobre la capacidad de transducción de vectores lentivirales, se prepararon polímeros de polí(beta-amino éster) conjugados con péptidos y se utilizaron para recubrir vectores lentivirales y probar la transducción de células HEK293T. Los vectores lentivirales portaban un transgén de proteína fluorescente verde (GFP), y la transducción se cuantificó por la expresión de GFP en las células hospedadoras transducidas (véase la figura 4A). Se conjugaron péptidos que tenían diferentes grupos de aminoácidos cargados con el esqueleto del polímero para probar el efecto de la carga. Las partículas del vector con y sin proteína VSV-G en sus envolturas se recubrieron con polímero. La eficacia de la encapsulación con polímeros se evaluó determinando la capacidad de transducción de los vectores en presencia de anticuerpos contra VSV-G, que tienen la capacidad de bloquear la transducción que depende de las proteínas VSV-G expuestas (véase la figura 4B), pero no bloquearán la transducción por un vector que esté efectivamente encapsulado con polímeros y no dependa de la VSV-G expuesta para la transducción (véase la figura 4C). Se realizaron experimentos similares con LV carentes de VSV-G; esta estrategia se representa en las figuras 5A-5C. Estos "LV bald" no fueron capaces de realizar la transducción debido a la falta de proteína VSV-G, pero se volvieron capaces de transducir después de su encapsulación con polímeros PBAE. No se esperaba que la transfección habilitada por polímeros fuera bloqueada por el anticuerpo anti VSV-G Ab.

25 Los vectores encapsulados se prepararon de la siguiente manera. Las diluciones del vector se prepararon en un primer conjunto de microtubos de 1.5 mL con un volumen final de 150 μ L por réplica, y las diluciones del polímero se prepararon en un segundo conjunto de microtubos de 1.5 mL con los mismos volúmenes finales. A continuación, el polímero diluido se agregó al vector diluido y la mezcla se homogeneizó pipeteando suavemente para evitar la formación de burbujas o espuma. Las mezclas de encapsulación se incubaron durante 30 minutos a +4 °C.

30 Para la cuantificación de la transducción, las células se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad de 8×10^4 células por pocillo en medio completo que contenía 10 % de FBS y se incubaron durante 4 h para adherirse. Para probar la neutralización de la transducción por el anticuerpo anti-VSV-G, se mezclaron 300 μ L de vector encapsulado con 300 μ L de medio de cultivo celular completo o con 300 μ L de suero de conejo polyclonal anti-VSVg diluido 100 veces en medio de cultivo celular completo, y se incubó 30 minutos a 37 °C, 5 % de CO₂. Luego, las células se transdujeron reemplazando el medio con 300 μ L de vector en medio de neutralización de anticuerpos o medio de cultivo sin anticuerpos, seguido de una incubación a 37 °C, 5 % de CO₂ durante 2 h. Después de la adsorción, se agregó 1 mL de medio completo a cada pocillo. A las 72 h posteriores a la transducción, las células se tripsinizaron y se volvieron a suspender en 200 μ L de Cellfix 1X, y se determinó el porcentaje de células que expresaban GFP con un citómetro de flujo Attune NxT utilizando el canal BL1.

35 Los polímeros utilizados en los experimentos de encapsulación fueron polímeros de polí(beta-amino éster) (PBAE) como se muestra en la fórmula a continuación, conjugados con péptidos cargados (Pep) y opcionalmente colesterol (R). El polímero R se refiere a PBAE conjugado con el péptido CRRR (el mismo péptido en ambos extremos). El polímero H se refiere a PBAE conjugado con el péptido CHHH. El polímero E se refiere a PBAE conjugado con el péptido CEEE. El polímero D se refiere a PBAE conjugado con el péptido CDDD. Se probaron mezclas de los péptidos en diferentes proporciones indicadas en las tablas a continuación. R/H se refiere a una mezcla 60/40 de polímeros R y H. Los polímeros indicados con "chol" también se conjugaron con colesterol como el grupo R indicado en la estructura a continuación. El valor de "m" fue 3 y el valor de "o" fue 1.



Las siguientes tablas muestran las mezclas de polímeros y la proporción de moléculas de polímero por partícula LV utilizadas para la encapsulación y probadas para la capacidad de transducción.

Influencia de la carga en el recubrimiento LV (HEK293T)	
1 ^a serie: Prueba de polímeros con carga negativa (con lote piloto LV-GFP)	
Polímero R mezclado con polímero E:	100/0- 66/33 - 33/66- 0/100
Polímero R-chol mezclado con polímero E-chol:	100/0- 66/33 - 33/66- 0/100
Polímero R mezclado con polímero E-chol:	100/0- 66/33 - 33/66- 0/100
Polímero R-chol mezclado con polímero E:	100/0- d6/33 - 33/66- 0/100
Prueba en 3 proporciones polímero/LV: 10 ⁹ , 10 ¹⁰ y 10 ¹¹ , +/- anticuerpo	

5

Tabla 1. Recubrimientos de polímero utilizados para probar el efecto de la carga.

Mejora del recubrimiento LV con polímeros D y K (HEK293T)	
2 ^{da} serie: si los polímeros cargados negativamente mejoran la encapsulación con el lote piloto LV-GFP)	
Polímero R mezclado con polímero E:	100/0- 66/33 - 33/66- 0/100
Polímero R mezclado con polímero D:	100/0- 66/33 - 33/66- 0/100
Polímero R-chol mezclado con polímero E-chol:	100/0- 66/33 - 33/66- 0/100
Polímero R-chol mezclado con polímero D-chol:	100/0- 66/33 - 33/66- 0/100
Polímero K mezclado con polímero E:	100/0- 66/33 - 33/66- 0/100
Polímero K mezclado con polímero D:	100/0- 66/33 - 33/66- 0/100
Polímero K-chol mezclado con polímero E-chol:	100/0- 66/33 - 33/66- 0/100
Polímero K-chol mezclado con polímero D-chol:	100/0- 66/33 - 33/66- 0/100
Prueba de la mejor proporción polímero/LV, +/- anticuerpo	

Tabla 2. Otros recubrimientos poliméricos utilizados para probar el efecto de la carga.

Evaluación del recubrimiento de LV sin VSV-G (HEK293T)	
2 ^{da} serie: si los polímeros cargados negativamente mejoran la encapsulación – prueba de LV sin VSV-G (con el lote piloto LV-GFP y lotes UC de LV-GFP +/- VSV-G)	
Polímero R/H mezclado con polímero E:	100/0- 66/33 - 33/66- 0/100
Polímero R/H mezclado con polímero D:	100/0- 66/33 - 33/66- 0/100
Polímero R/H mezclado con polímero E-chol:	100/0- 66/33 - 33/66- 0/100
Polímero R/H mezclado con polímero D-chol:	100/0- 66/33 - 33/66- 0/100

Prueba en 3 proporciones polímero/LV: 10^9 , 10^{10} y 10^{11} , +/- anticuerpo

Tabla 3. Recubrimientos de polímero utilizados con LV sin VSV-G.

Para probar el efecto del recubrimiento de polímero sobre la capacidad de transducción de vectores lentivirales recubiertos de polímero que carecen de proteína de envoltura viral, se conjugaron péptidos que tenían diferentes aminoácidos cargados al esqueleto del polímero y los polímeros resultantes se usaron para recubrir vectores lentivirales y probar la transducción de células HEK293T.

Los datos de expresión de GFP se obtuvieron como resultados del citómetro de flujo después de la transducción con vectores que tenían las proporciones indicadas de moléculas de polímero por partícula de vector lentiviral (LV). En cada condición, la adición de suero de conejo anti-VSV-G polyclonal redujo la tasa de transducción con una proporción de 10^9 , pero Ab no logró reducir la transducción en proporciones de 10^{10} y 10^{11} , lo que indica que se necesitaban al menos aproximadamente 10^{10} polímeros por partícula de LV para una encapsulación eficaz. Los datos también confirmaron que el LV encapsulado con polímero pudo llevar a cabo la transducción de manera eficaz, y que el polímero cargado positivamente es más eficaz, y la eficacia de la transducción disminuye con el aumento de la introducción de carga negativa en el polímero.

Se llevó a cabo un experimento similar utilizando un polímero PBAE conjugado con colesterol. Los resultados fueron similares a los del polímero que no estaba conjugado con colesterol para los polímeros R y E.

Se llevó a cabo un experimento similar utilizando LV que carecía de la proteína de envoltura VSV-G ("LV bald"). Los resultados indicaron que el LV bald sin envoltura no pudo inducir la transducción. Sin embargo, el LV bald encapsulado en polímero pudo transducir eficazmente las células en proporciones de moléculas de polímero/LV de 10^9 , 10^{10} o 10^{11} . Como se esperaba, la adición de Ab anti-VSV-G no tuvo efecto. Los polímeros con carga positiva fueron mucho más eficaces que los polímeros con carga neutra o negativa. Se obtuvieron resultados similares utilizando polímero conjugado con colesterol, y también para mezclas de polímeros que contenían péptidos R+H y D, con o sin colesterol.

Ejemplo 4. Efecto del pH durante el recubrimiento polimérico de vectores lentivirales \pm VSV-G.

Se prepararon LV recubiertos con PBAE que carecían de VSV-G o que expresaban VSV-G y se llevó a cabo su transducción de células Jurkat como se describe en el ejemplo 3, excepto que las células se cultivaron en suspensión y se varió el pH de la solución de recubrimiento. Se utilizó solución reguladora de acetato a un pH entre 4.5 y 6, solución reguladora de citrato a un pH entre 4.5 y 6, solución reguladora de histidina a un pH entre 6 y 7, y solución reguladora Tris a un pH entre 7 y 8. En cada condición de pH, el número de moléculas de polímero por partícula de LV se varió desde 10^6 a 10^{10} . La estabilidad del VSV-G+ LV se muestra en la figura 7. Los vectores fueron estables en el intervalo de pH de 4.5 a 8.0 y se pueden mantener en esos intervalos de pH hasta 120 minutos.

Las figuras 8A-8H muestran los resultados de un experimento para probar la estabilidad de partículas de LV bald en las diferentes soluciones reguladoras de pH sin encapsulación de polímero. Para VSV-G+ LV, la integridad se evaluó midiendo su capacidad para transducir células HEK293T y causar la expresión de GFP (detectada por FACS). Para VSV-G- LV (bald), la integridad se evaluó midiendo la liberación de proteína p24 (un indicador de lisis de las partículas del vector; p24 se midió en sobrenadantes por ELISA), ya que no fue posible la transducción utilizando LV bald no recubiertas de polímero. La integridad física se determinó después de 15, 30, 60, 90 y 120 minutos en las diferentes soluciones reguladoras de pH. Los resultados no indicaron pérdida de integridad para ninguno de los tipos de LV hasta 120 min, aunque las condiciones de pH más altas fueron ligeramente menos favorables para la viabilidad del LV que las condiciones de pH más bajo. Los datos en bruto para la retención y liberación de p24 en LV bald se muestran en las figuras 8A-8H.

La figura 9 muestra los resultados de la encapsulación de LV bald a diferentes valores de pH, seguida de la transducción de células HEK293T y la expresión de GFP detectada por FACS. Como se esperaba de otros experimentos discutidos en el ejemplo 1, el recubrimiento completo de polímero del LV bald, que dio como resultado un LV capaz de transducción, requirió al menos aproximadamente 10^9 moléculas de PBAE por partícula de LV para obtener partículas viables. Se observó una clara dependencia del pH para el procedimiento de recubrimiento. Un pH más alto (pH 7) prácticamente no produjo LV infeccioso, mientras que el recubrimiento a un pH en el intervalo desde aproximadamente 5.0 a aproximadamente 6.5 dio buenos resultados de transducción. El derivado de R/H PBAE (PBAE conjugado con péptidos CRRR mezclados con PBAE-CHHH en una proporción de 60/40 vol/vol, véase el ejemplo 1) se utilizó para el recubrimiento en este experimento. Cabe destacar que la figura 9 también muestra que la encapsulación parcial por polímero da como resultado una falta de capacidad de transducción, lo que demuestra que el uso de vectores virales que carecen de proteína de envoltura potenciará el perfil de seguridad. Sin esta característica, las partículas de vector cuyo recubrimiento de polímero se pierde, parcial o completamente, o se degrada parcialmente, o las partículas de vector que se han recubierto de forma incompleta durante la producción, podrían representar un problema de seguridad debido a la posible transducción de células no dirigidas.

La figura 10 muestra los resultados de un experimento similar al representado en la figura 9, pero utilizando una mezcla (60/40) de los polímeros R-colesterol-PBAE y H-colesterol-PBAE. La adición de colesterol redujo la proporción polímero/partícula LV necesaria para encapsular completamente el LV bald a un pH bajo.

En la figura 11 se muestra un experimento en el que se prueba el recubrimiento del VSV-G+ LV a diferentes valores de pH. Se utilizó el polímero R-PBAE para la encapsulación y también se probó la sensibilidad al anticuerpo anti-VSV-G+. Los resultados indican poca sensibilidad del pH a las tasas de transducción generales, pero la sensibilidad del anticuerpo (indicativa de un recubrimiento de polímero incompleto) fue mayor a pH 6.5 que a valores de pH más bajos.

5 Otra indicación de un recubrimiento más completo a pH más bajo se ve en la transducción basal más alta en presencia del anticuerpo anti-VSV-G a pH 5.

Ejemplo 4. Transducción de linfocitos utilizando vectores lentivirales encapsulados ±VSV-G.

Transducción de células Jurkat y linfocitos humanos

Para cuantificar la transducción, las células Jurkat se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad de 8×10^4 células por pocillo en medio completo que contenía 10 % de FBS y 1 % de penicilina/estreptomicina. Se agregaron 300 μ L de vector encapsulado a las células. Después de 2 h de incubación a 37 °C, 5 % de CO₂, se agregaron 500 μ L de medio completo fresco a cada pocillo. El porcentaje de células que expresaban transgenes GFP o mCherry se determinó 72 h después de la transducción con un citómetro de flujo Attune NxT (Thermo Fisher) utilizando el canal BL1 o YL1 respectivamente. El fenotipo de las células transducidas que expresaban el transgén GFP se determinó mediante tinción de citometría de flujo con diferentes anticuerpos específicos para los siguientes tipos de células siguiendo las instrucciones del fabricante (BD Biosciences): CD3 (linfocitos T) y CD19 (linfocitos B).

10 15 La transducción de linfocitos humanos se llevó a cabo con el mismo método excepto que se sembraron 10^5 células/pocillo.

Citotoxicidad

20 Los linfocitos humanos se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad de 5×10^5 células por pocillo en medio completo que contenía 10 % de FBS y 1 % de penicilina/estreptomicina. Se agregaron a las células 300 μ L de vector que expresa CAR CD19 encapsulado. Después de 2 h de incubación, se agregaron 500 μ L de medio completo fresco a cada pocillo. Después de 48 h de incubación a 37 °C, 5 % de CO₂, se agregaron células tumorales Ramos CD19-positivas en proporciones linfocito/célula tumoral de 50:1 o 1:1. Después de 4 h de incubación a 37 °C, 5 % de CO₂, las células que expresaban el CAR CD19 se tiñeron con proteína L y se detectaron con un citómetro de flujo ATTUNE NXT (Thermo Fisher) utilizando el canal YL1. Las células y linfocitos CD19 positivos se cuantificaron mediante tinción de citometría de flujo con anticuerpos específicos CD19 o CD3 (BD Biosciences) según las instrucciones del fabricante.

Preparación y transducción de PBMC de ratón

30 Las células mononucleares de sangre periférica de ratón (PBMC) recién preparadas se aislaron a partir de sangre completa heparinizada utilizando tubos LEUCOSEP (Greiner bio-one) llenos de FICOLL-PAOUE PREMIUM 1.084 (GE Healthcare). Después de la dilución de la sangre con DPBS, las PBMC se separaron mediante un gradiente de densidad de FICOLL, se lavaron dos veces con DPBS y se volvieron a suspender hasta obtener la densidad celular deseada en un medio de cultivo.

35 Las células se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad de 2×10^5 células por pocillo en medio RPMI que contenía 10 % de FBS y 1 % de penicilina/estreptomicina. Se agregaron 300 μ L de vector encapsulado a las células. Después de 2 h de incubación a 37 °C, 5 % de CO₂, se agregaron 500 μ L de medio completo fresco a cada pocillo. El porcentaje de células que expresaban GFP se determinó 48 h después de la transducción con un citómetro de flujo Attune NxT utilizando el canal BL1. El fenotipo de las células transducidas que expresan el transgén GFP se determinó mediante tinción de citometría de flujo con diferentes anticuerpos específicos para los siguientes tipos de células siguiendo las instrucciones del fabricante (BD Biosciences): CD4 (linfocitos T colaboradores), CD8 (linfocitos citotóxicos), CD19 (linfocitos B), Ly-6G (granulocitos), CD11b (macrófagos), CD11c (células dendríticas) y F4/80 (monocitos).

40 45 La figura 12 muestra la expresión de GFP y la viabilidad celular de las células Jurkat transducidas con el LV encapsulado en PBAE indicado en presencia y ausencia de anticuerpo anti-VSV-G. Los resultados están normalizados a las condiciones de anticuerpo negativo como 100 %. Una amplia variedad de polímeros de encapsulación y proporciones polímero/vector no pudieron bloquear la inhibición por el anticuerpo, lo que indica que la proteína VSV-G sobresalía a través del recubrimiento de polímero en todas las condiciones analizadas y mediaba la transducción.

50 En las figuras 13A-13D, se muestra la expresión de mCherry como una medida de la transducción de células Jurkat por LV bald encapsulado por los polímeros PBAE indicados, con y sin conjugación de colesterol, y en una variedad de diferentes proporciones polímero/vector y carga neta de polímero.

55 Los resultados de la transducción de linfocitos humanos utilizando diferentes vectores se muestran en las figuras 14A-14D. El número de partículas de vector por linfocito aumenta de izquierda a derecha en cada figura. La figura 14A muestra los resultados obtenidos para el VSV-G+ LV típico; se observó poca transducción, como también fue el caso para el VSV-G- LV (bald) no encapsulado que se muestra en la figura 14B. Sin embargo, la encapsulación del LV bald con R/H (60/40 vol/vol), proporción 1.10e+9 PBAE por LV con o sin 10E+4 PGA-Fab condujo a una transducción exitosa y dependiente de la dosis como se muestra en la figura 14C. En el experimento que se muestra en la figura

14D, también se obtuvo una fuerte transducción después de agregar una unidad estructural de direccionamiento (PGA Fab) al LV bald encapsulado con PBAE. El experimento cuyos resultados se muestran en la figura 14E demuestra que la transducción adicional de linfocitos humanos con un CAR específico para CD19 fue compatible con una fuerte transducción del transgén LV. Además, los resultados que se muestran en la figura 14F revelan que los linfocitos humanos transducidos con un CAR específico para CD19 fueron capaces de ejercer una acción citotóxica contra las células cancerosas positivas para CD19.

5 La figura 15 muestra los resultados de experimentos en los que se transfectaron PBMC de ratón con LV no encapsulado VSV-G⁺ (dos barras a la izquierda) o LV bald encapsulado con PBAE (dos barras a la derecha). El LV bald encapsulado mostró una transducción mucho más fuerte que los vectores VSV-G⁺ para cada tipo de célula 10 presente en la preparación de PBMC.

Referencias:

- Nayerossadat, Maedeh, T, Ali, PA. Viral and nonviral delivery systems for gene delivery, *Adv Biomed Res*, 2102, 1 :27
- Green, JJ Langer, R, and Anderson, DG, A. Combinatorial Polymer Library Approach Yields Insight into Nonviral Gene Delivery, *Acc. Chem. Res*, 2008, 41 (6), pp 749-759
- 15 He Y, Munn D, Falo LD Jr. Recombinant lentivector as a genetic immunization vehicle for antitumor immunity, *Expert Rev Vaccines*, 2007 Dec;6(6):913-24
- Zennou V, Petit C, Guetard D, Nerhbass U, Montagnier L, Charneau P. HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap, *Cell*. 2000 Apr 14;101(2):173-85
- 20 Arhel NJ, Souquere-Besse S, Munier S, Souque P, Guadagnini S, Rutherford S, Prévost MC, Allen TD, Chameau P. HIV-1 DNA Flap formation promotes uncoating of the pre-integration complex at the nuclear pore, *EMBO J*. 2007 Jun 20;26(12):3025-37
- Coutant F, Sanchez David RY, Félix T, Boulay A, Caleechurn L, Souque P, Thouvenot C, Bourgouin C, Beignon AS, Charneau P. A nonintegrative vector lentiviral-based vaccine provides long-term sterile protection against malaria, *PLoS One*. 2012;7(11)
- 25 Karwacz K, Mukherjee S, Apolonia L, Blundell MP, Bouma G, Escors D, Collins MK, Thrasher AJ. Nonintegrating lentivector vaccines stimulate prolonged T-cell and antibody responses and are effective in tumor therapy, *J Virol*. 2009 Apr;83(7):3094-103
- Anderson, DJ, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2004, 101:16028-33.
- Lynn DM, Langer, R, J. Am Chem Soc 2000, 122:10761-10768.
- 30 Mangaviti, et al., ACS Nano 2015, 9:1236-1249.
- Negri DR, Michelini Z, Baroncelli S, Spada M, Vendetti S, Buffa V, Bona R, Leone P, Klotman ME, Cara A. Successful immunization with a single injection of non-integrating lentiviral vector, *Mol Ther*. 2007 Sep;15(9):1716-23
- Hu B, Dai B, Wang P. Vaccines delivered by integration-deficient lentiviral vectors targeting dendritic cells induces strong antigen-specific immunity, *Vaccine*. 2010 Sep 24;28(41):6675-83
- 35 Montenarh M. Biochemical properties of the growth suppressor/oncoprotein p53. *Oncogene*. 1992 Sep;7(9):1673-80
- Como se utiliza en el presente documento, "que consiste esencialmente en" permite la inclusión de materiales o etapas que no afectan materialmente las características básicas y novedosas de la reivindicación. Cualquier mención en el presente documento del término "que comprende", en particular en una descripción de componentes de una composición o en una descripción de elementos de un dispositivo, puede sustituirse por "que consiste esencialmente en" o "que consiste en".
- 40 Si bien la presente tecnología se ha descrito junto con determinadas realizaciones preferidas, un experto, después de leer la especificación anterior, podrá efectuar diversos cambios, sustituciones de equivalentes y otras alteraciones a las composiciones y métodos establecidos en el presente documento.

REIVINDICACIONES

1. Una nanopartícula que comprende un vector viral recubierto con un polímero o una mezcla de polímeros, en la que el vector viral comprende un transgén, y en la que la nanopartícula funciona como un vehículo para administrar el transgén a células eucariotas, en la que el vector viral carece de proteína de envoltura.

5 2. La nanopartícula de la reivindicación 1, en la que el polímero o la mezcla de polímeros comprende un poli(beta-aminoéster) que tiene la fórmula



en la que cada Pep es un oligopéptido; en la que R es OH, CH₃ o colesterol; y en la que m varía desde 1 a 20. n varía desde 1 a 100, y o varía desde 1 a 10.

10 3. La nanopartícula de la reivindicación 2, en la que cada oligopéptido comprende al menos tres residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en arginina (R), ácido glutámico (E), lisina (K), ácido aspártico (D), histidina (H) y cisteína (C), preferiblemente en la que la secuencia de aminoácidos de al menos uno de los oligopéptidos es CRRR (SEQ ID NO:1), o CHHH (SEQ ID NO:2), o CKKK (SEQ ID NO:3), o CEEE (SEQ ID NO:4), o CD₃ (SEQ ID NO:5).

15 4. La nanopartícula de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el polímero o la mezcla de polímeros tiene una carga neta positiva o una carga neta negativa a pH 7.

5. La nanopartícula de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la nanopartícula contiene desde 10⁸ a 10¹² moléculas de polímero por vector, preferiblemente en la que la nanopartícula contiene desde aproximadamente 10⁹ a aproximadamente 10¹⁰ moléculas de polímero por vector.

20 6. La nanopartícula de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el vector viral es un vector retroviral, preferiblemente en la que el vector retroviral es un vector lentiviral.

7. La nanopartícula de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además una o más unidades estructurales de direccionamiento unidas a una o más moléculas de polímero, preferiblemente en la que la unidad estructural de direccionamiento se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, scFv, armazones proteínicos similares a anticuerpos, oligopéptidos, aptámeros, aptámeros de L-ARN y ligandos para receptores de la superficie celular; por ejemplo, la unidad estructural de direccionamiento es un anticuerpo anti-CD3 o un aptámero anti-CD3.

25 8. La nanopartícula de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el transgén codifica un receptor de antígeno quimérico.

30 9. La nanopartícula de cualquiera de las reivindicaciones anteriores que tiene un potencial zeta de aproximadamente -15 mV a aproximadamente +15 mV.

10. La nanopartícula de cualquiera de las reivindicaciones anteriores que carece de proteína de envoltura VSV-G, preferiblemente en la que la nanopartícula tiene un perfil de seguridad mejorado para uso *in vivo* en comparación con una nanopartícula similar que comprende proteína de envoltura VSV-G.

35 11. La nanopartícula de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el vector viral carece de proteína de envoltura viral, y en la que la nanopartícula solo es capaz de transducir una célula de mamífero por encima de un número umbral de moléculas de polímero por vector, preferiblemente:

(i) en la que por debajo de dicho número umbral de moléculas de polímero por vector, la cantidad de polímero es insuficiente para recubrir completamente el vector, y/o

40 (ii) en la que por debajo de dicho número umbral de moléculas de polímero por vector, la nanopartícula es estructuralmente inestable o está sujeta a la disociación de las moléculas de polímero de la nanopartícula, y/o

(iii) en la que la nanopartícula tiene un perfil de seguridad mejorado para uso *in vivo* en comparación con un vector o un vector encapsulado en polímero que carece de dicho umbral.

45 12. Un método de fabricación de la nanopartícula de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, comprendiendo el método las etapas de:

(a) proporcionar un vector viral que comprende un transgén, en la que el vector viral carece de proteína de envoltura;

(b) proporcionar un polímero o una mezcla de polímeros, y opcionalmente una o más unidades estructurales de direccionamiento; y

5 (c) poner en contacto el vector viral y el polímero o la mezcla de polímeros, y opcionalmente la una o más unidades estructurales de direccionamiento, con lo que el vector viral y el polímero o la mezcla de polímeros se combinan para formar dicha nanopartícula.

13. El método de la reivindicación 12, en el que:

(i) la etapa (c) se realiza a un pH de aproximadamente 5.0 a aproximadamente 6.5, preferiblemente a un pH de aproximadamente 5.5 a 6.0, o la etapa (c) se realiza a un pH en la que el polímero o la mezcla de polímeros tiene una carga neta positiva y el vector retroviral tiene un potencial de superficie negativo, y/o (ii) el polímero o la mezcla de polímeros comprende un poli(beta-aminoéster) que tiene la fórmula



en la que cada Pep es un oligopeptido; en la que R es OH, CH₃ o colesterol; y en la que m varía desde 1 a 20, n varía desde 1 a 100 y o varía desde 1 a 10, preferiblemente en la que cada oligopeptido comprende al menos tres residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en R, E, K, D, H y C, y/o

15 (iii) el vector retroviral es un vector retroviral, tal como un vector lentiviral, y/o

(iv) el método que comprende además poner en contacto el vector con una o más unidades estructurales de direccionamiento, opcionalmente en la que las unidades estructurales de direccionamiento están unidas al polímero o mezcla de partículas.

20 14. La nanopartícula de cualquiera de las reivindicaciones 1-11 para su uso en un método para tratar una enfermedad, tal como el cáncer, comprendiendo el método administrar una composición que comprende una pluralidad de dichas nanopartículas a un sujeto que la necesita, con lo que las células del sujeto son transducidas por el vector retroviral y el transgén se expresa en las células transducidas.

25 15. Un método para transducir células *in vitro*, comprendiendo el método poner en contacto células cultivadas con una pluralidad de nanopartículas de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, mediante el cual al menos algunas de las células cultivadas son transducidas por el vector retroviral y el transgén se expresa específicamente en las células transducidas, preferiblemente en la que las nanopartículas están dirigidas a células CD3-positivas y el transgén se expresa específicamente en células CD3-positivas, o en la que el transgén codifica un receptor de antígeno quimérico.

30 16. La nanopartícula de cualquiera de las reivindicaciones 1-11 para su uso en un método para realizar terapia génica, comprendiendo el método poner en contacto células *in vitro* o dentro de un organismo vivo con una pluralidad de dichas nanopartículas, con lo que el transgén se expresa en las células.

35 17. Una nanopartícula que comprende un vector viral recubierto con un polímero o una mezcla de polímeros, en la que el vector viral comprende un nivel reducido de proteína de envoltura, y comprende un transgén, en la que la nanopartícula funciona como un vehículo para entregar el transgén a las células eucariotas, y en la que el nivel reducido de proteína de envoltura es insuficiente para promover la entrada celular del vector y la transducción de las células por el vector, preferiblemente en la que el nivel reducido de proteína de envoltura es 5 % o menos de una cantidad de proteína de envoltura en un virus funcional del cual se derivó el vector.

ES 2 991 922 T3

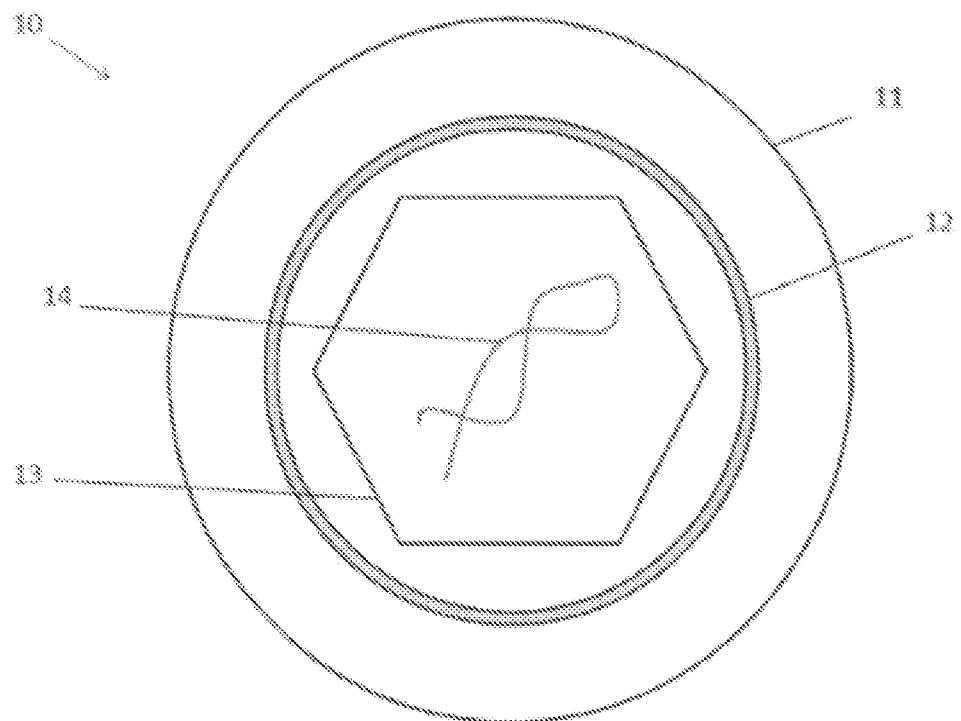


FIG. 1A

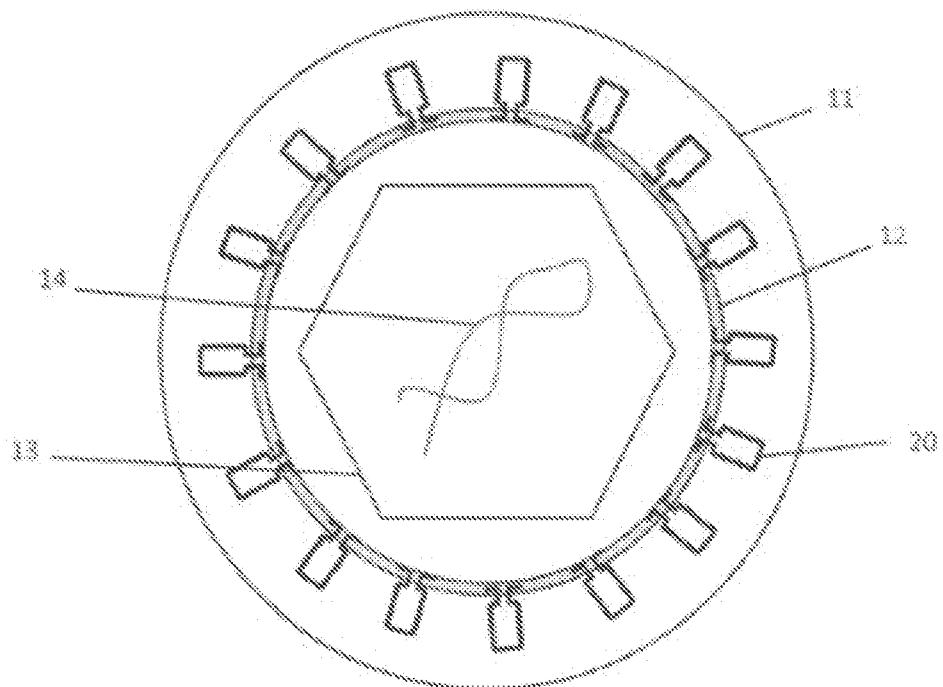


FIG. 1B

ES 2 991 922 T3

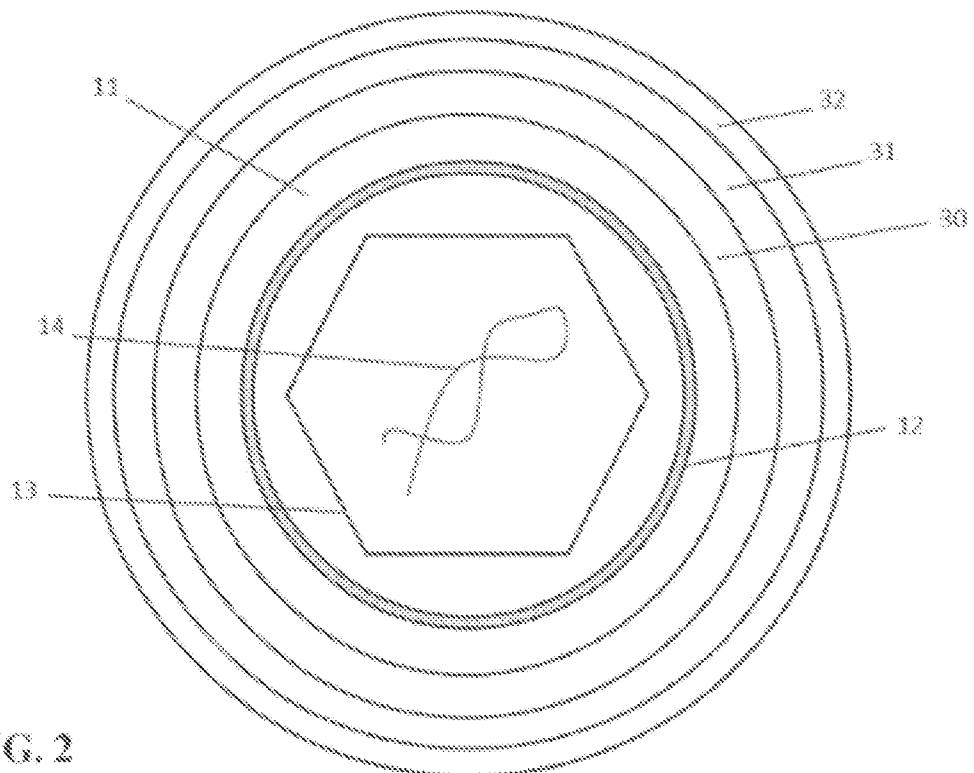


FIG. 2

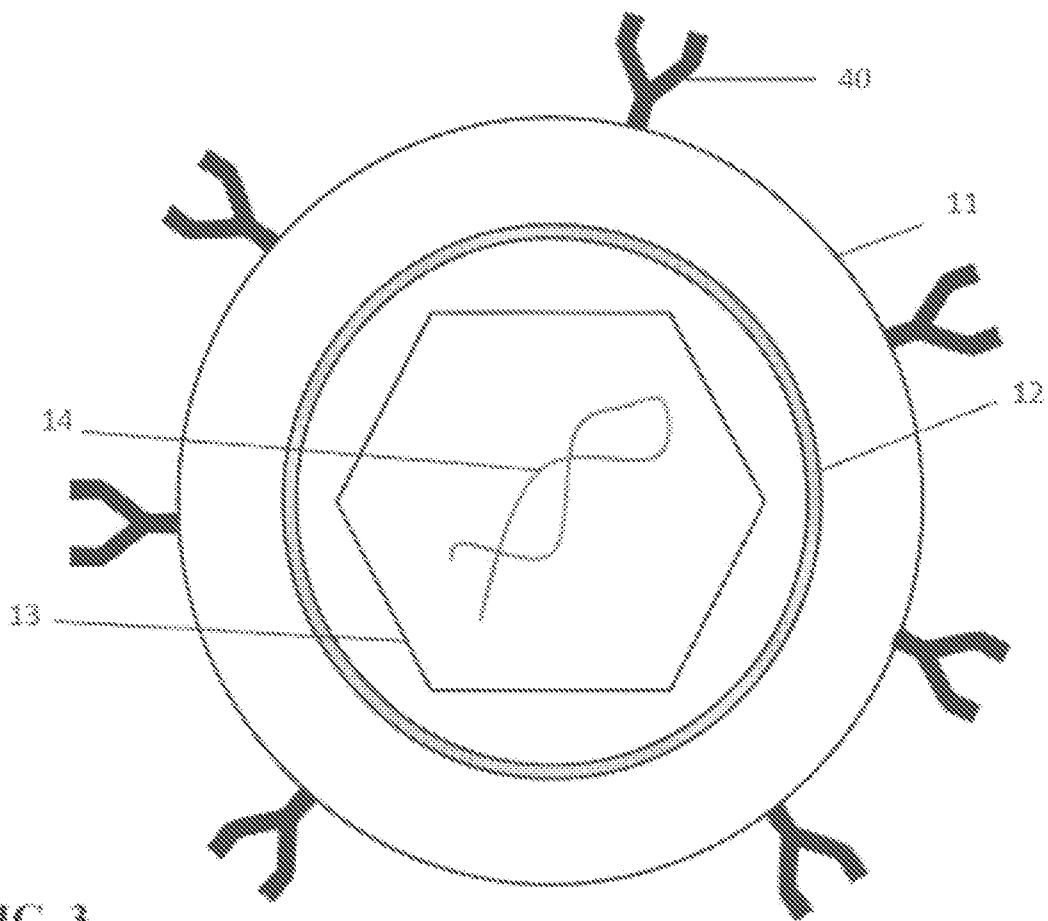


FIG. 3

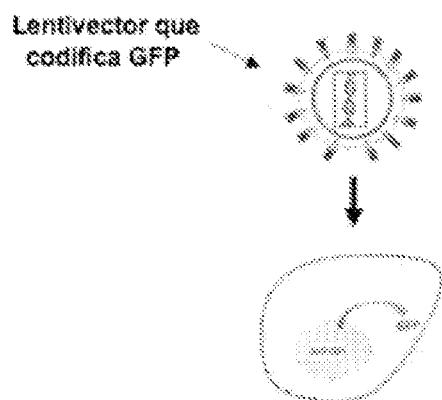


FIG. 4A

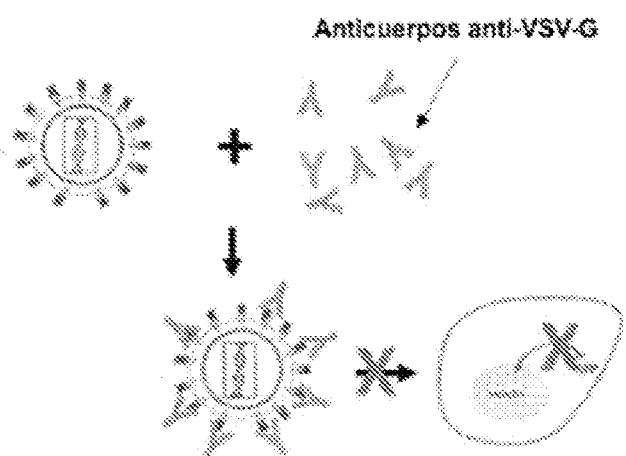


FIG. 4B

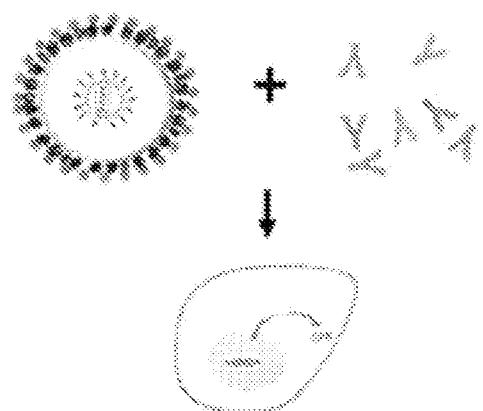


FIG. 4C

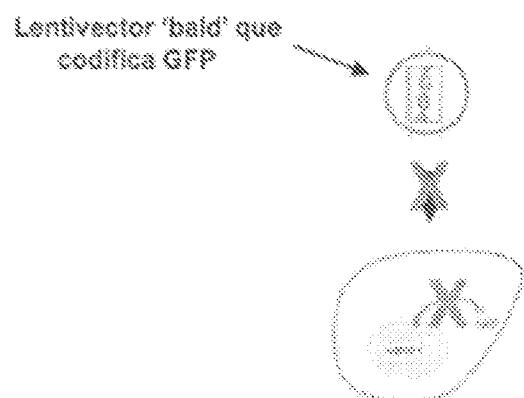


FIG. 5A

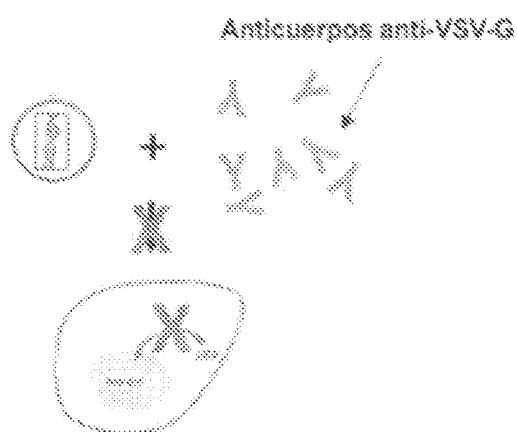


FIG. 5B

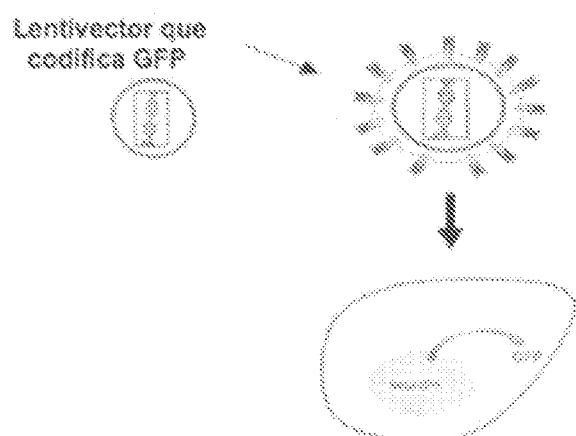


FIG. 5C

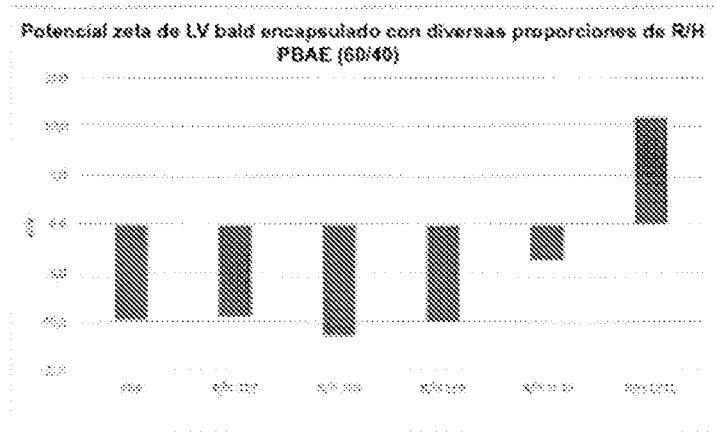


Fig. 6A-1

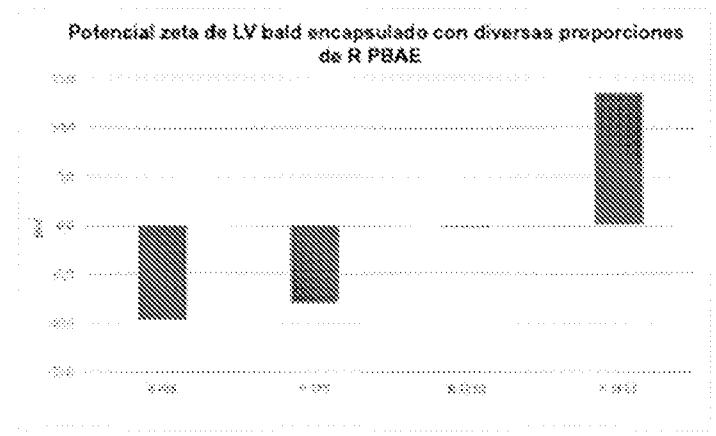


Fig. 6A-2

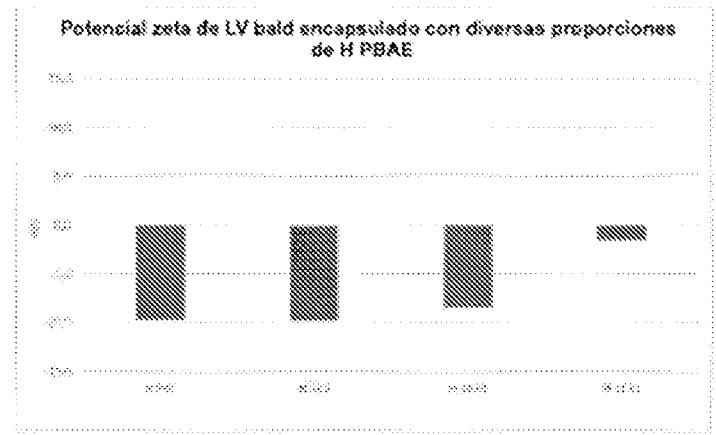


Fig. 6A-3

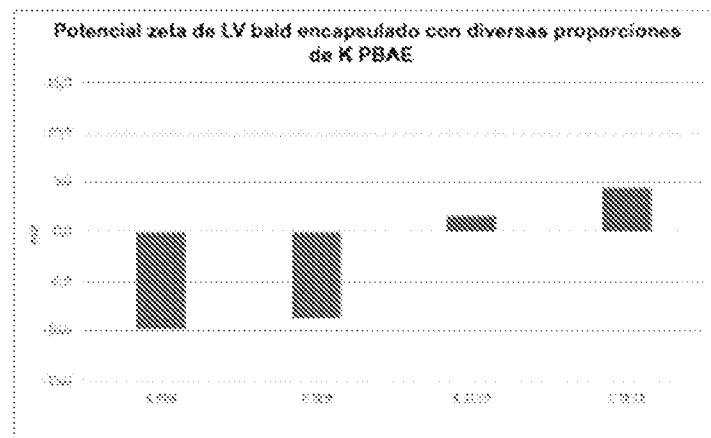


Fig. 6A-4

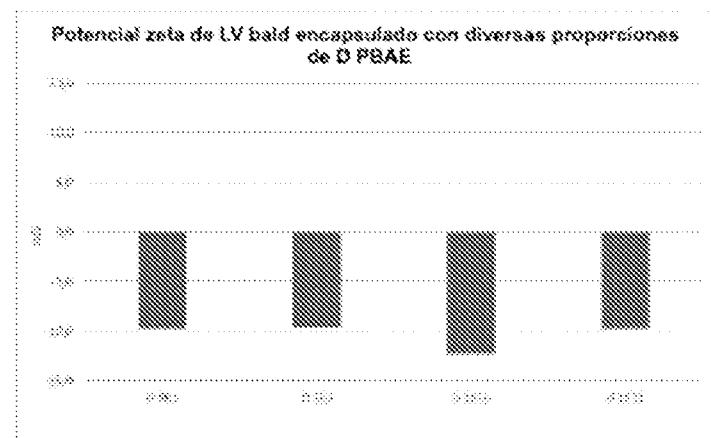


Fig. 6A-5

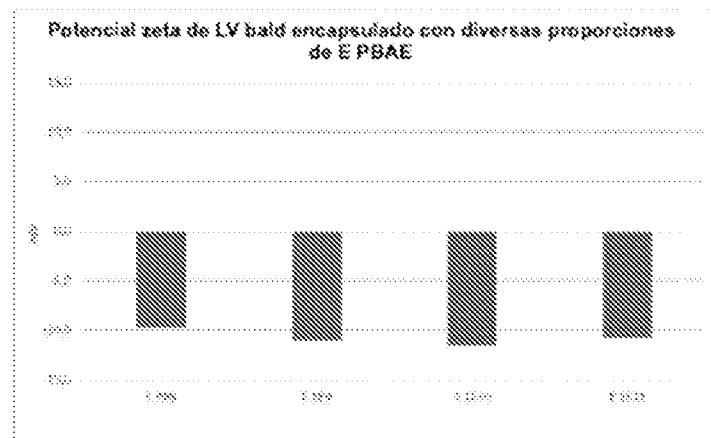


Fig. 6A-6

ES 2 991 922 T3

Potencial zeta de LV bald encapsulado con diversas proporciones de R/H
PBAE (80/40)

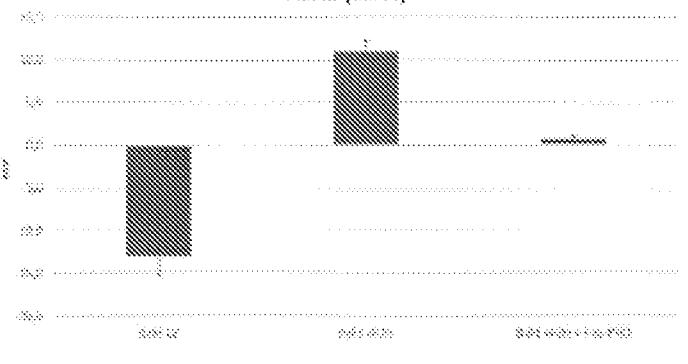


Fig. 6A

Potencial zeta de LV bald encapsulado con diversas proporciones de
R PBAE

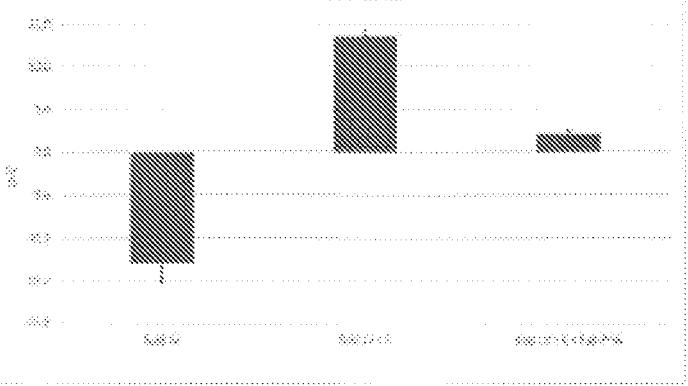


Fig. 6B

Potencial zeta de LV bald encapsulado con diversas proporciones de
H PBAE

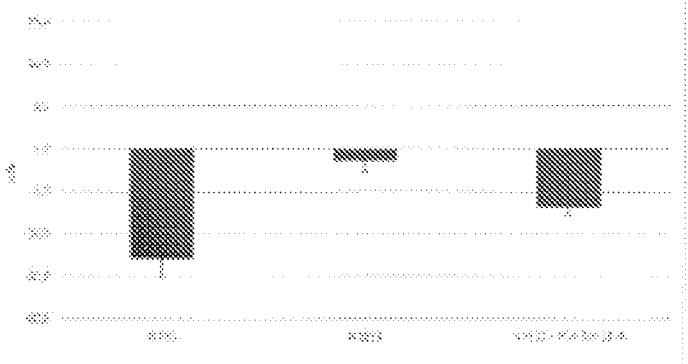


Fig. 6C

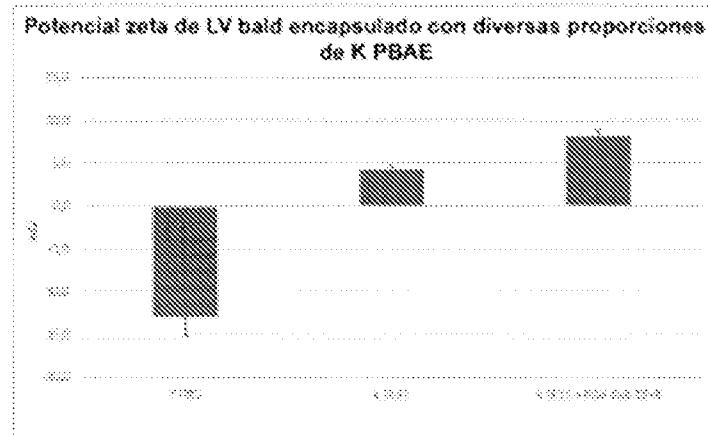


Fig. 6D

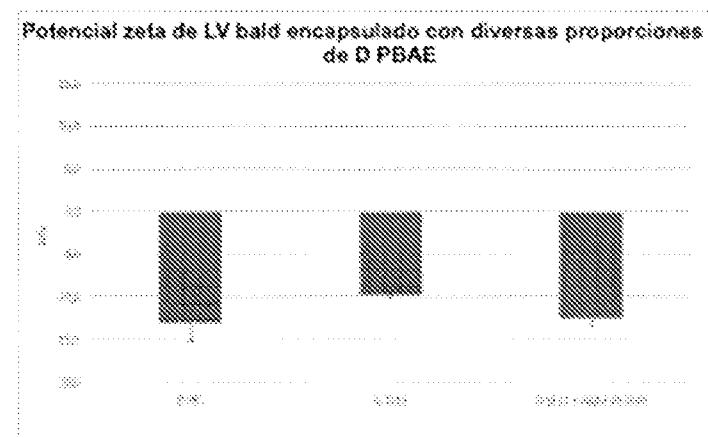


Fig. 6E

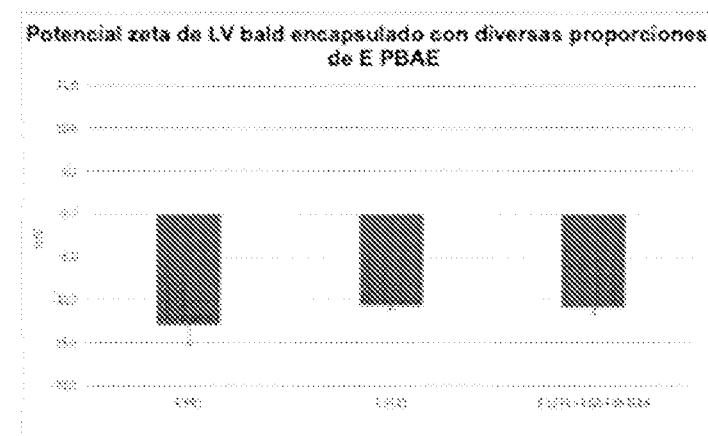
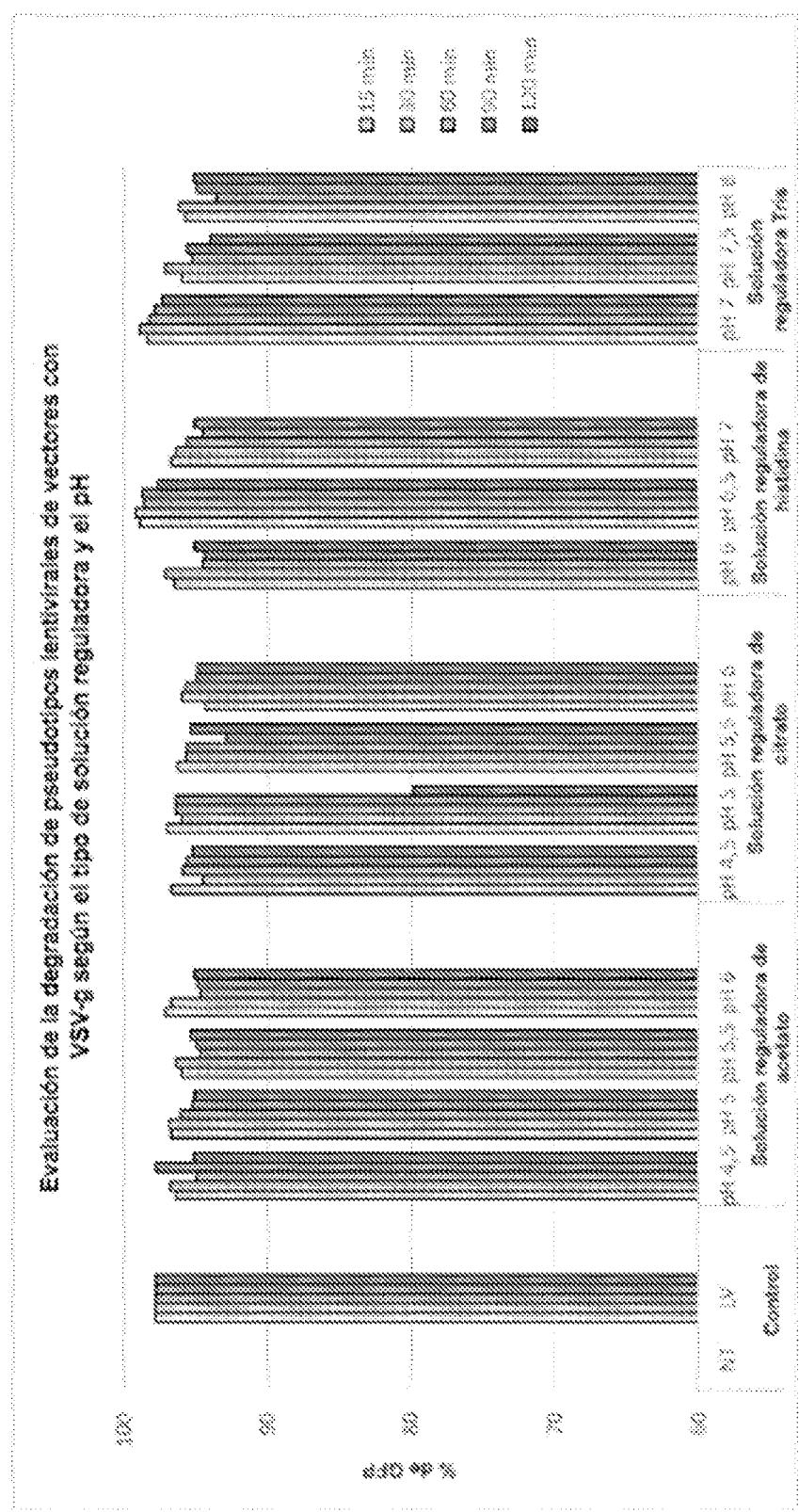


Fig. 6F



p24 asociada a LV (ng/mL)

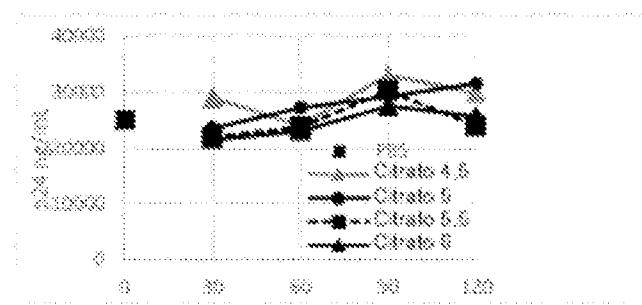


Fig. 8A

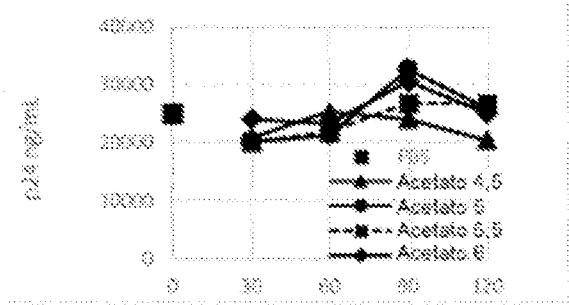


Fig. 8B

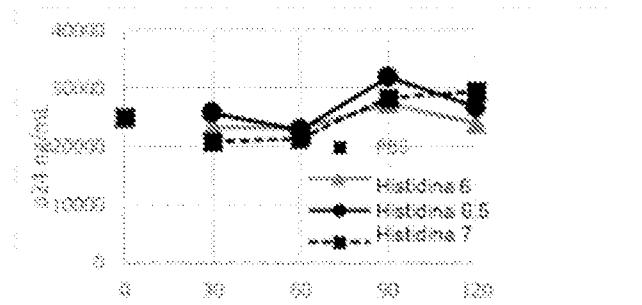


Fig. 8C

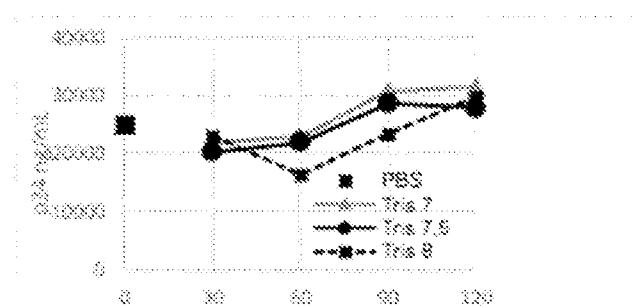


Fig. 8D

p24 libre >10g/mL)

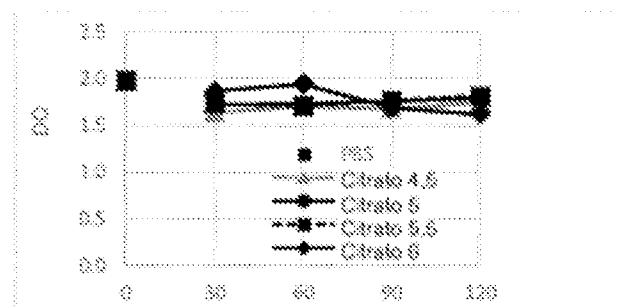


Fig. 8E

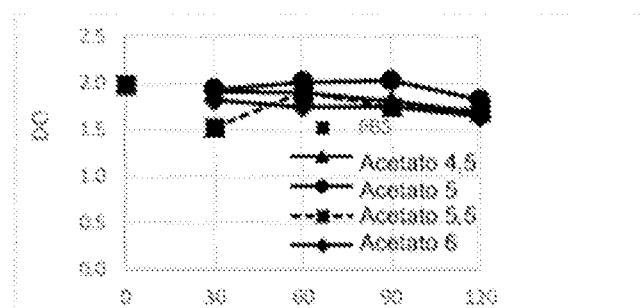


Fig. 8F

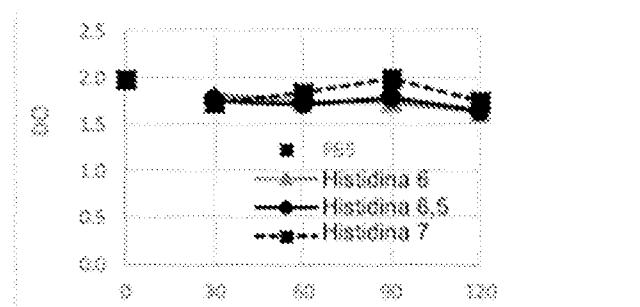


Fig. 8G

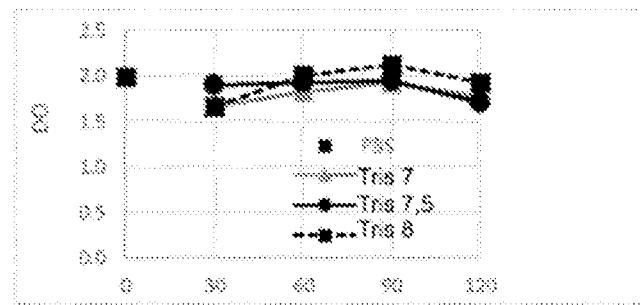


Fig. 8H

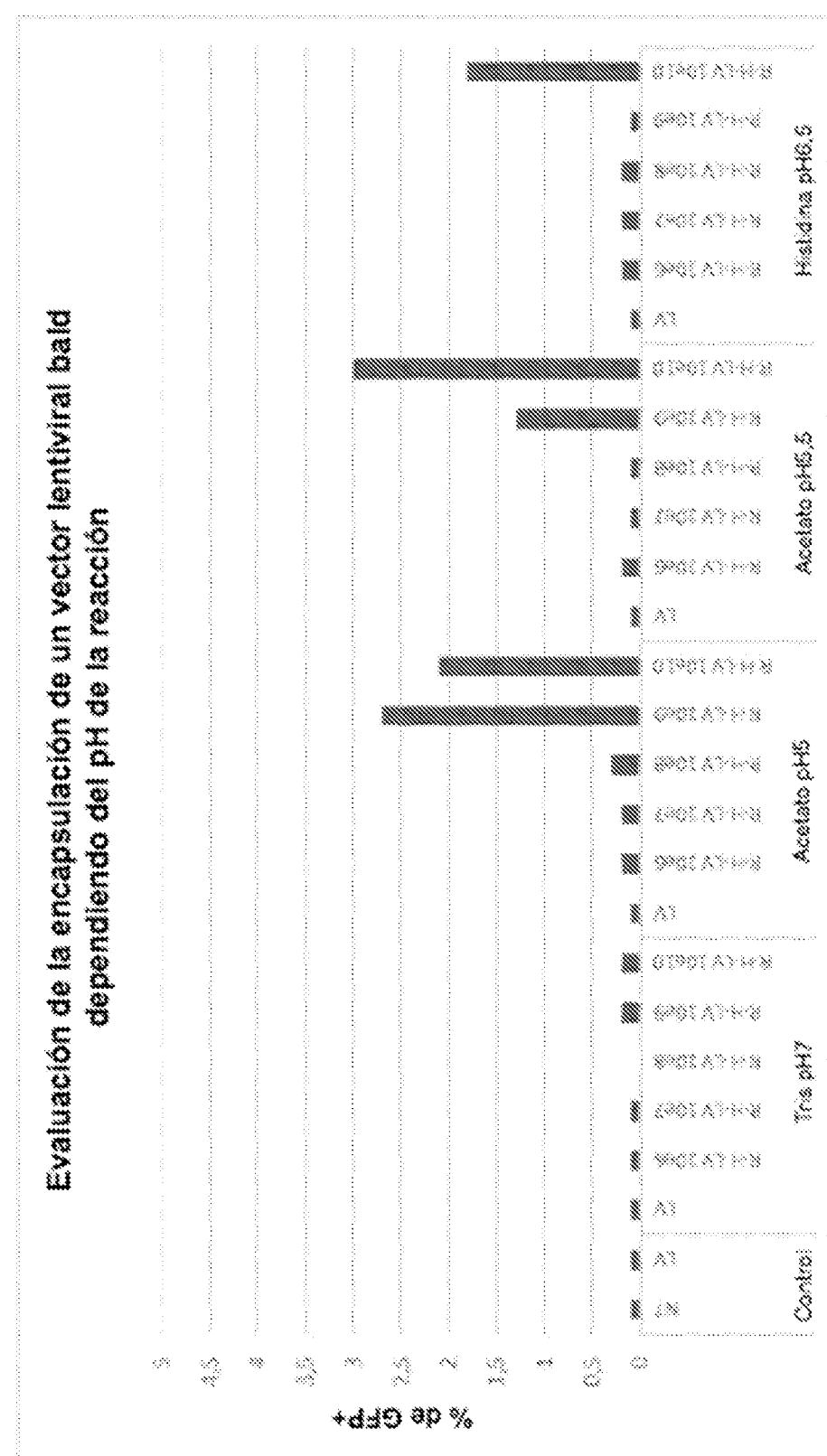


FIG. 9

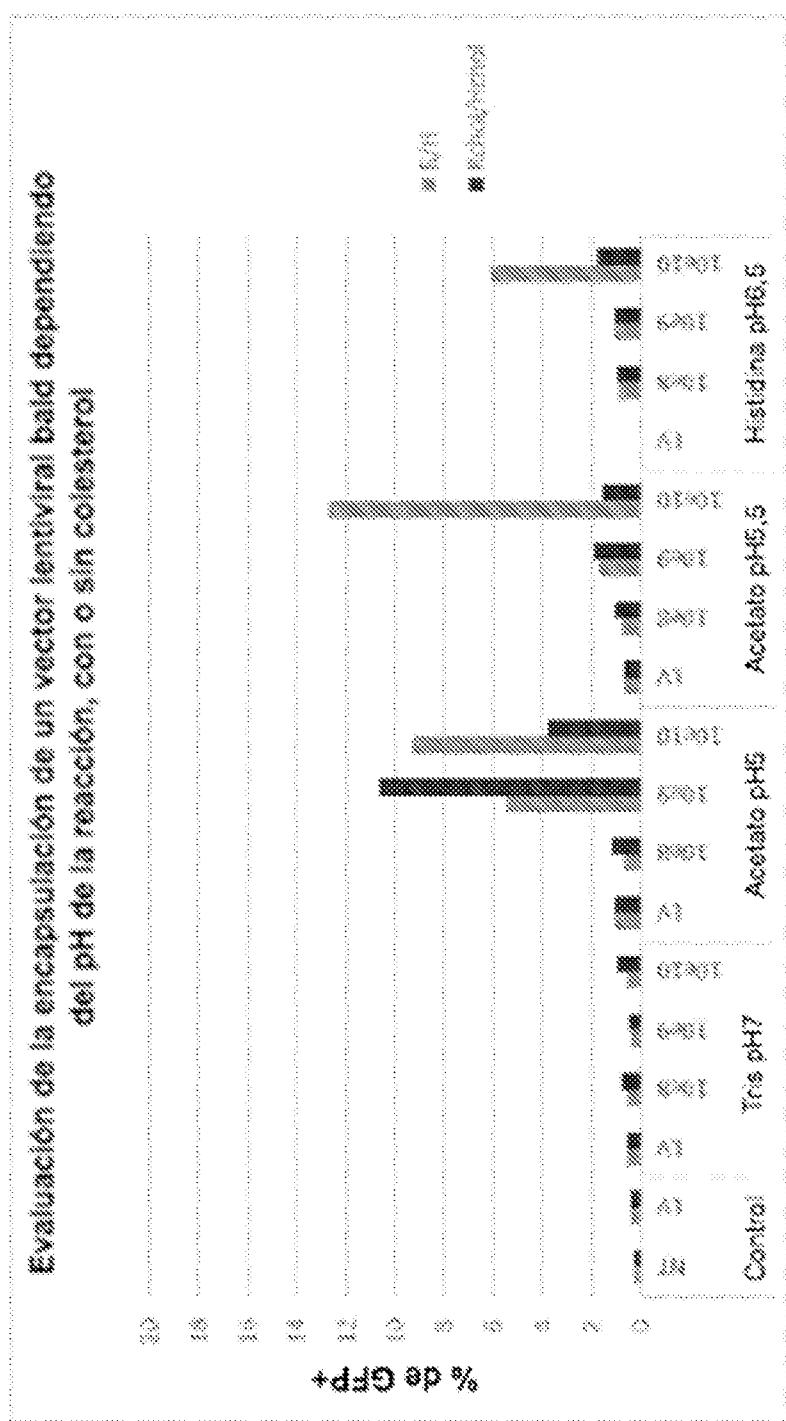


FIG. 10

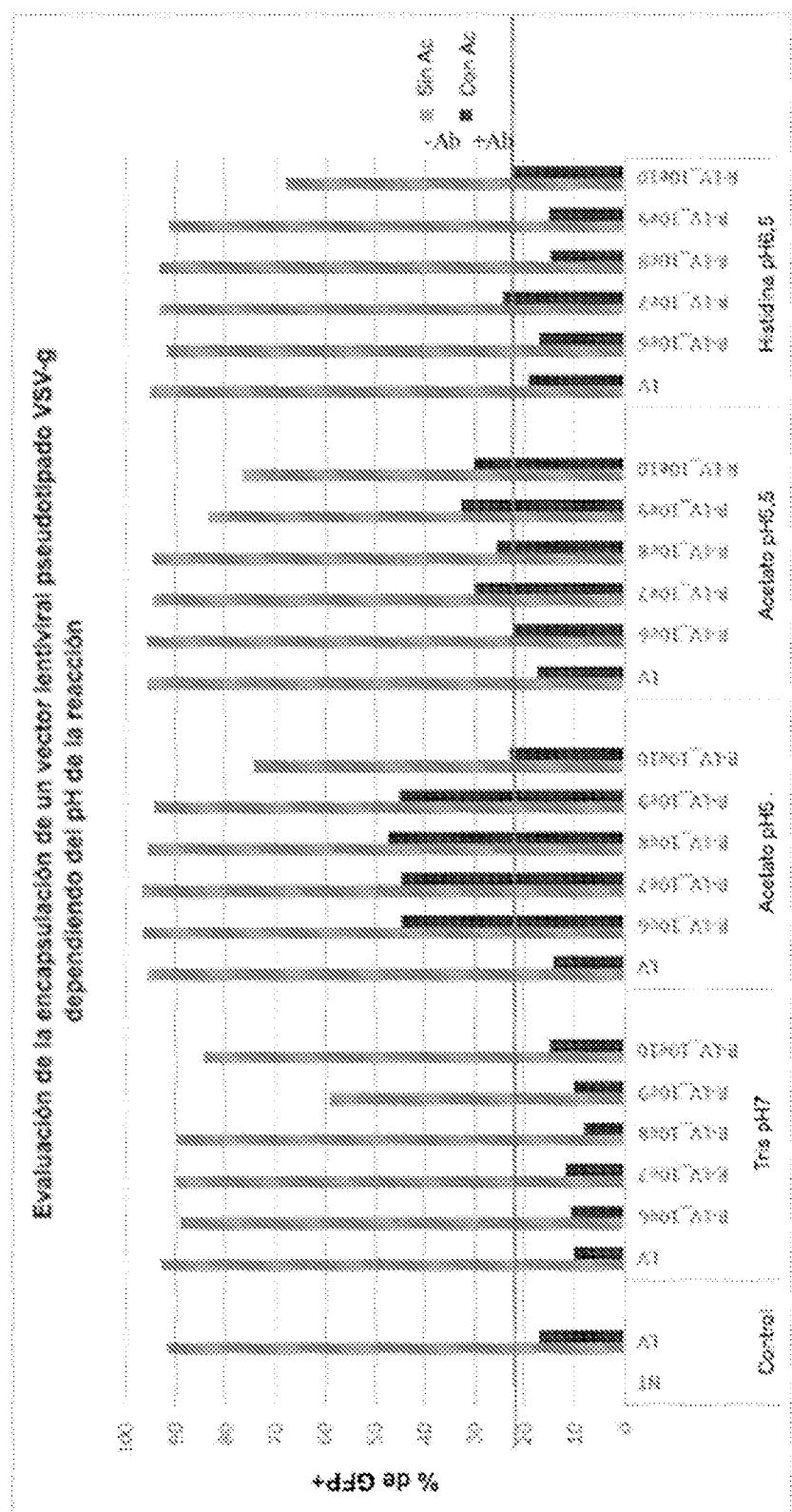


FIG. II

ES 2 991 922 T3

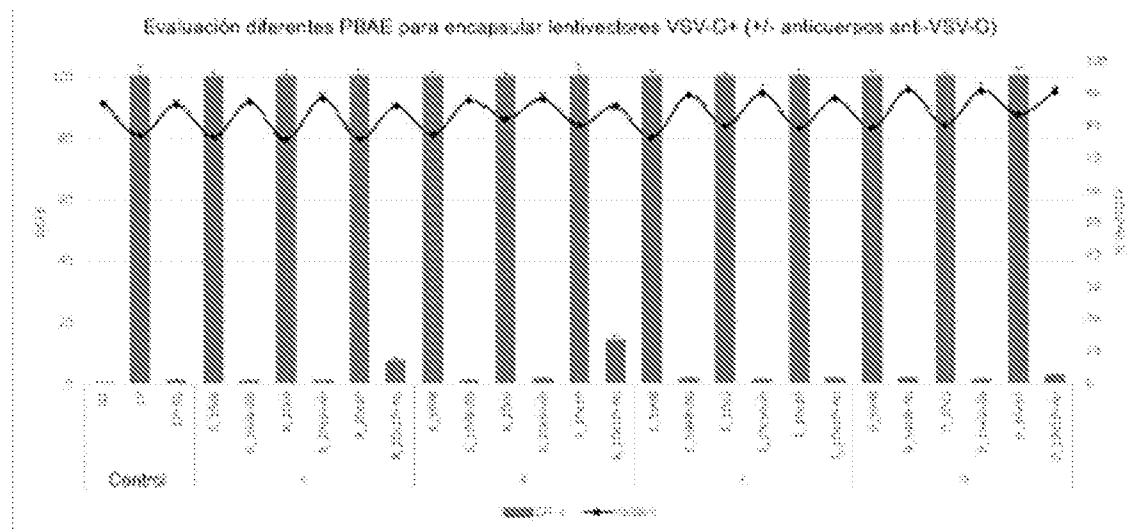


Fig. 12

ES 2 991 922 T3

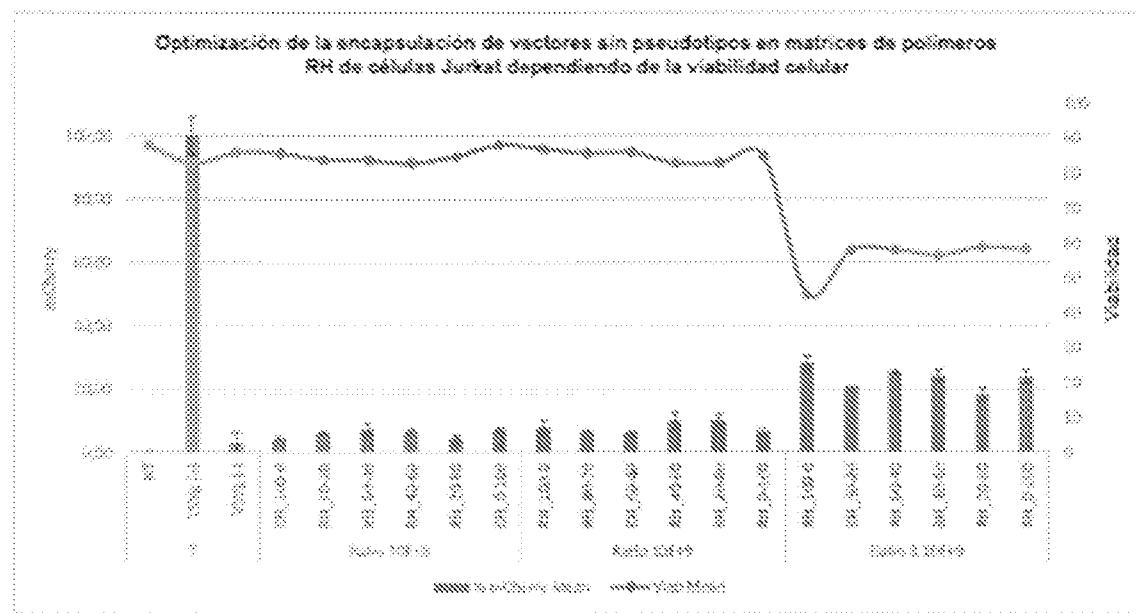


Fig. 13A

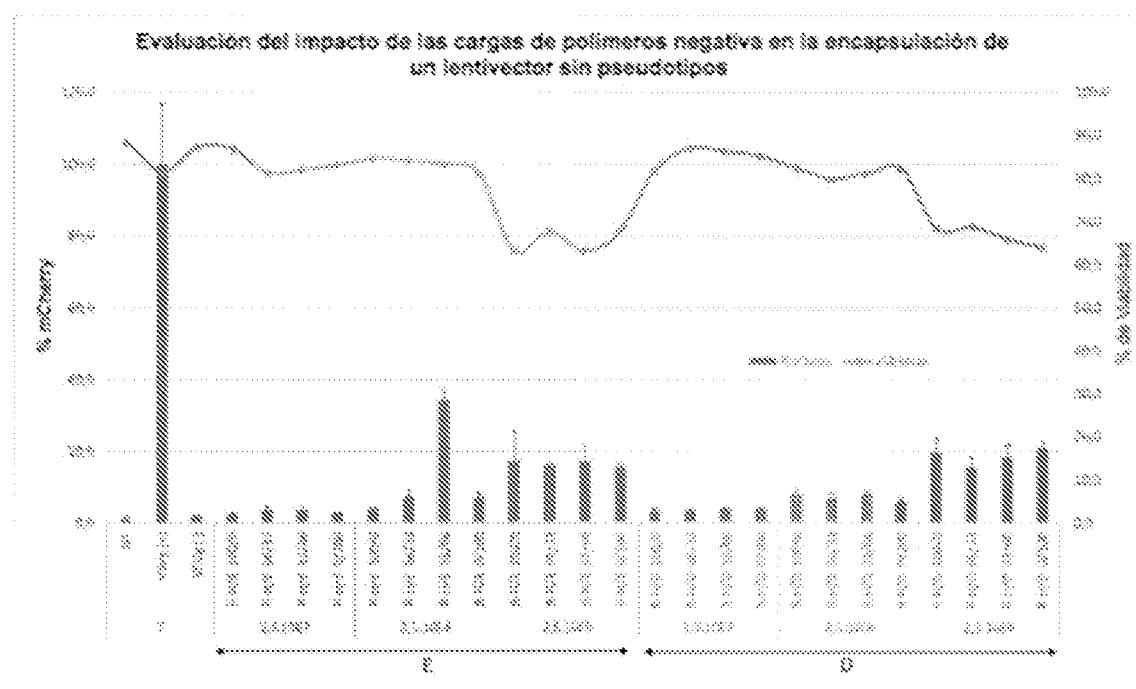


Fig. 133

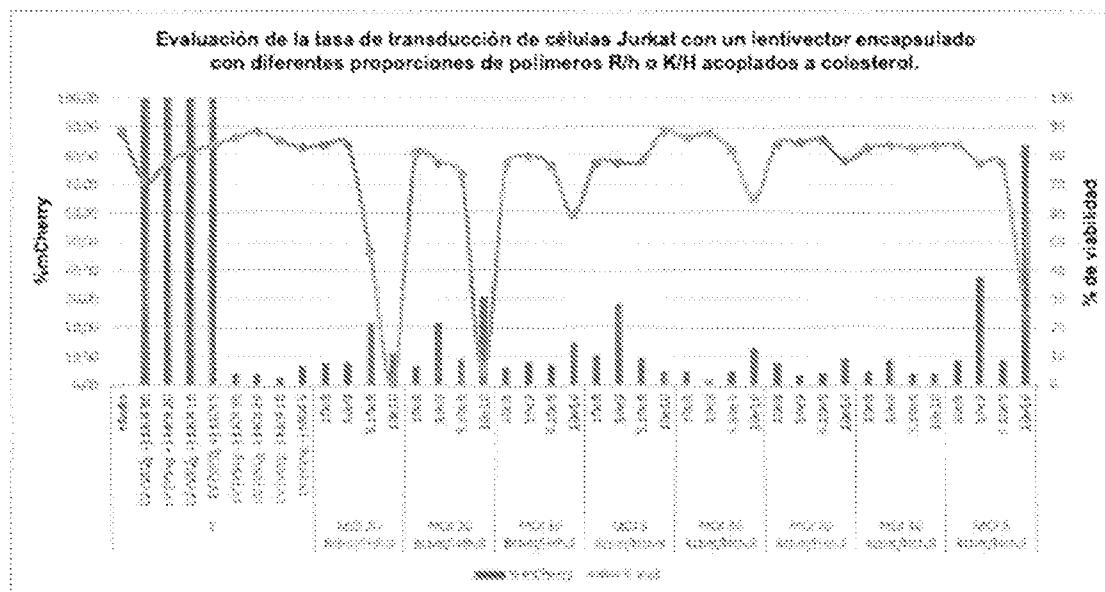


Fig. 13C

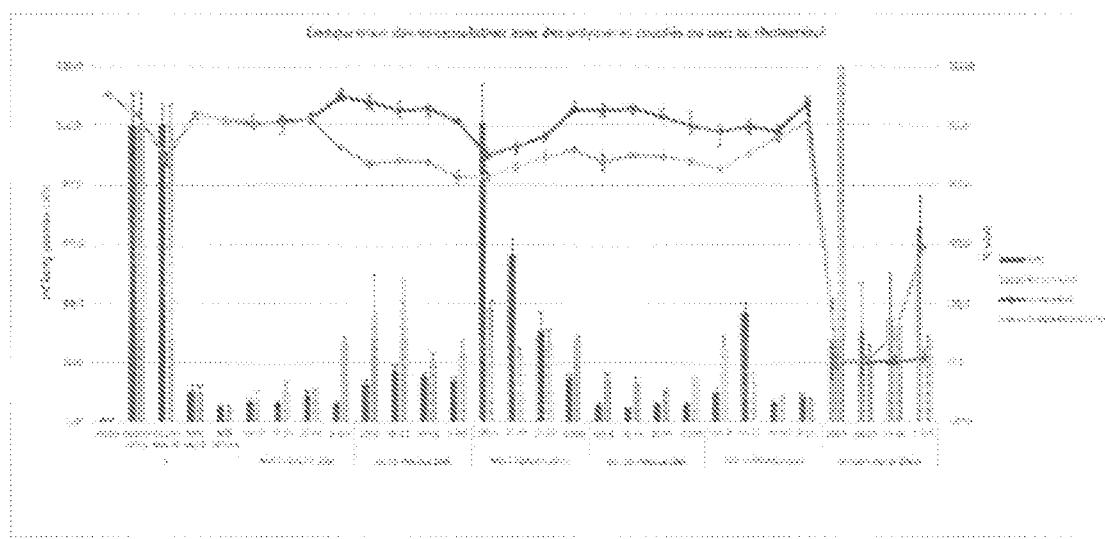


Fig. 13D

Transducción de linfocitos humanos con VSV-G+ LV

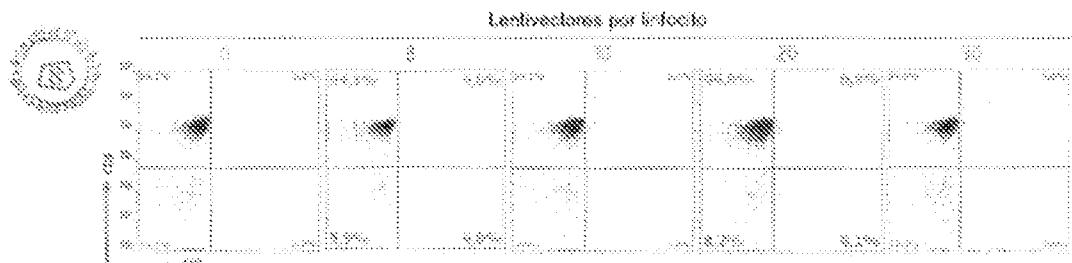


Fig. 14A

Transducción de linfocitos humanos con LV bald

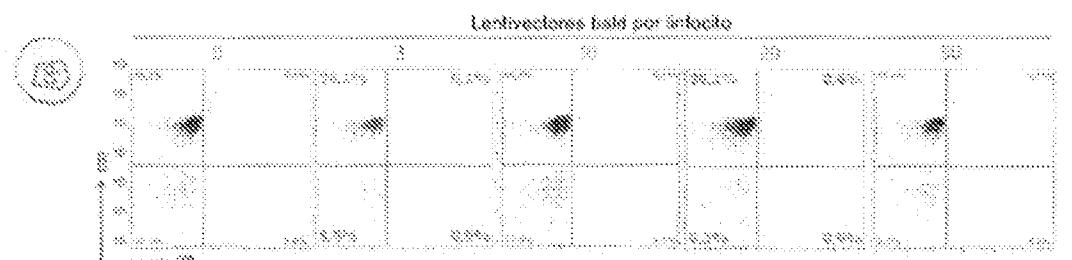


Fig. 14B

Transducción de linfocitos humanos con LV bald encapsulado

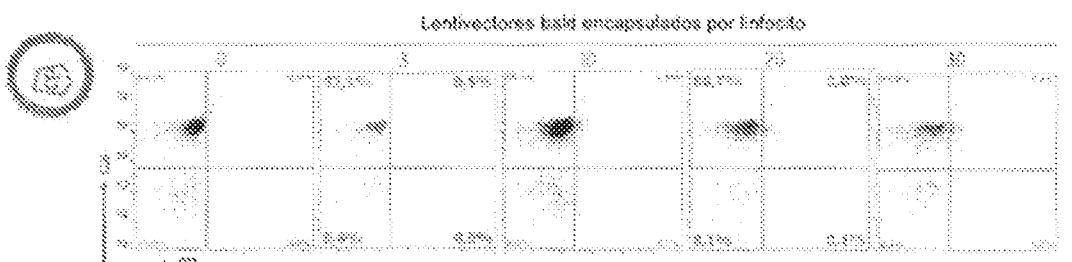


Fig. 14C

Transducción de linfocitos humanos con LV bald encapsulado + PGA-Fab



Fig. 14D

Los linfocitos humanos se transdijeron con un CAR-CD19 MOI 20

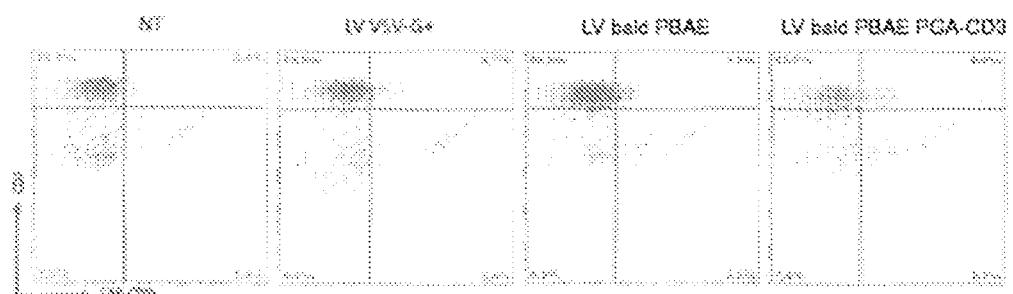


Fig. 14E

Los linfocitos transducidos se pusieron en contacto con células cancerosas CD19+ humanas (Ramos) y se evaluó la citotoxicidad después de 4 horas midiendo la distribución de células CD19+

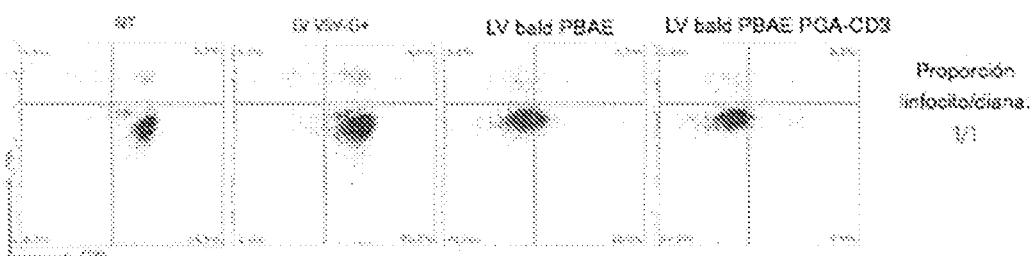


Fig. 14F

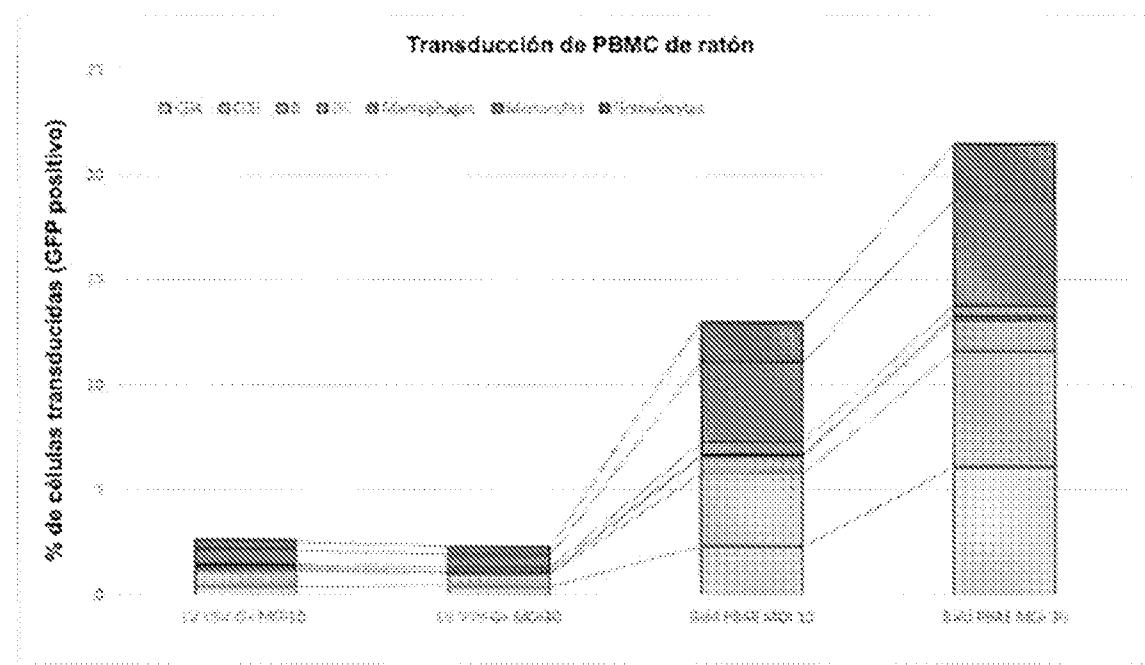


Fig. 15