

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
COURBEVOIE

(11) **Nº de publication :** 3 044 017  
(à n'utiliser que pour les commandes de reproduction)  
(21) **Nº d'enregistrement national :** 16 61254  
(51) Int Cl<sup>8</sup> : C 12 N 15/867 (2017.01), C 12 N 7/01, C 12 N 15/87

(12)

## BREVET D'INVENTION

B1

(54) PROCÉDE DE TRANSFECTION TRANSITOIRE POUR LA PRODUCTION RETROVIRALE.

(22) **Date de dépôt :** 21.11.16.

(30) **Priorité :** 24.11.15 GB 15207640;  
26.05.16 GB 16093544.

(60) **Références à d'autres documents nationaux apparentés :**

**Demande(s) d'extension :**

(71) **Demandeur(s) :** GLAXOSMITHKLINE  
INTELLECTUAL PROPERTY DEVELOPMENT  
LIMITED — GB.

(43) **Date de mise à la disposition du public de la demande :** 26.05.17 Bulletin 17/21.

(45) **Date de la mise à disposition du public du brevet d'invention :** 03.05.19 Bulletin 19/18.

(56) **Liste des documents cités dans le rapport de recherche :**

*Se reporter à la fin du présent fascicule*

(72) **Inventeur(s) :** JOHNSON SABINE, PALLANT  
CELESTE, VAMVA EIRINI et VINK CONRAD.

(73) **Titulaire(s) :** GLAXOSMITHKLINE INTELLECTUAL  
PROPERTY DEVELOPMENT LIMITED.

(74) **Mandataire(s) :** GEVERS & ORES.



DOMAINE DE L'INVENTION

L'invention concerne des vecteurs d'acide nucléique, en particulier des chromosomes artificiels bactériens, 5 comprenant des gènes nécessaires à la production rétrovirale et leurs utilisations. L'invention concerne également des procédés de production de particules de vecteur rétroviral défectif en réplication comprenant les vecteurs d'acide nucléique selon l'invention.

10

ARRIERE PLAN DE L'INVENTION

En thérapie génique, du matériel génétique est administré à des cellules endogènes chez un sujet ayant besoin d'un traitement. Le matériel génétique peut 15 introduire de nouveaux gènes chez le sujet ou bien introduire des copies supplémentaires de gènes préexistants, ou bien introduire différentes allèles ou variantes des gènes qui sont présents chez le sujet. Les systèmes de vecteurs viraux sont proposés comme procédé 20 d'administration efficace de gènes pour une utilisation en thérapie génique (Verma et Somia (1997) *Nature* 389 : 239-242).

En particulier, ces vecteurs viraux sont à base de membres de la famille des rétrovirus du fait de leur 25 capacité à intégrer leur héritage génétique dans le génome de l'hôte. Les vecteurs rétroviraux sont conçus pour garder les protéines essentielles nécessaires à l'emballage et à la distribution du génome rétroviral, mais toute protéine accessoire non essentielle, y compris celle responsable de 30 leur profil pathogène, est éliminée. Les exemples de vecteurs rétroviraux comprennent les vecteurs lentiviraux, comme ceux à base du virus de l'immunodéficience humaine de

type 1 (VIH-1), qui sont largement utilisés car ils sont capables de s'intégrer dans des cellules non prolifératives.

Actuellement, la majorité des vecteurs viraux sont produits par co-transfection transitoire de gènes viraux dans une lignée cellulaire hôte. Les gènes viraux sont introduits en utilisant des plasmides bactériens qui existent dans la cellule hôte seulement pendant un laps de temps limité car les gènes viraux restent sur les plasmides et ne sont pas intégrés dans le génome. En tant que tel, le matériel génétique transfecté transitoirement n'est pas transmis aux générations suivantes au cours de la division cellulaire.

Cependant, il existe de nombreux problèmes associés aux procédés de transfection transitoire actuellement utilisés, comme la variabilité d'un lot à un autre, le coût élevé des réactifs de transfection et la difficulté de maintenir le contrôle qualité (voir Segura *et al.* (2013) *Expert Opin. Biol. Ther.* 13(7) : 987-1011). Le procédé de transfection lui-même nécessite également beaucoup d'opérations et son passage à l'échelle supérieure constitue un défi. Il s'avère également difficile d'éliminer les impuretés plasmidiques qui sont charriées au cours de la préparation du vecteur (voir Pichlmair *et al.* (2007) *J. Virol.* 81(2) : 539-47).

Un objet de la présente invention vise par conséquent à proposer un procédé amélioré de transfection transitoire qui permet de surmonter un ou plusieurs des inconvénients associés aux procédés existants.

30

#### RESUME DE L'INVENTION

Les présents inventeurs ont développé un nouveau mode de production de vecteurs rétroviraux qui implique l'utilisation de vecteurs d'acide nucléique comprenant une origine de réPLICATION non mammifère et ont la capacité de 5 contenir au moins 25 kilobases (kb) d'ADN, comme les chromosomes artificielles bactériens, comprenant la totalité des gènes rétroviraux essentiels pour la production d'un vecteur rétroviral. Les procédés actuels de transfection transitoire nécessitent l'utilisation de 3 à 4 10 plasmides séparés porteurs des différents composants requis pour la production du rétrovirus à introduire dans la cellule hôte, ce qui prend énormément de temps et cause des problèmes liés à la pression de la sélection. Le procédé proposé par les présents inventeurs incorpore la totalité 15 des gènes rétroviraux essentiels sur un unique hybride qui peut être ensuite introduit dans une cellule hôte, ce qui réduit la quantité de matériel nécessaire pour transduire la cellule hôte aux fins de la production du vecteur viral. Par conséquent, cela réduit le coût de matières car un 20 unique vecteur seulement est utilisé, à l'inverse des procédés antérieurs qui utilisent de multiples vecteurs plasmidiques.

L'utilisation d'un vecteur d'acide nucléique comprenant une origine de réPLICATION non mammifère et 25 possédant la capacité de contenir au moins 25 kilobases (kb) d'ADN (c'est-à-dire un gros ADN hybride) présente plusieurs avantages. En premier lieu, les vecteurs peuvent être d'abord manipulés dans des cellules non mammifères (par exemple cellules microbienNES, comme les cellules bactériennes) à l'inverse des cellules mammifères hôtes, ce 30 qui les rend plus faciles à utiliser (par exemple des chromosomes artificielS bactériens peuvent être d'abord

manipulés dans *E. coli*). Une fois que le vecteur d'acide nucléique a été préparé, il peut être introduit dans une cellule hôte, comme une cellule hôte mammifère, pour la production d'un vecteur rétroviral.

5 L'utilisation des vecteurs d'acide nucléique de la présente invention apporte par conséquent des avantages en termes de génération de vecteurs rétroviraux.

10 Par conséquent, selon un premier aspect de l'invention, on propose un chromosome artificiel bactérien (BAC) caractérisé en ce que ledit BAC comprend des séquences d'acide nucléique rétroviral codant pour :

15 les protéines gag et pol, et  
une protéine env ou un substitut fonctionnel de celle-ci

dans lequel chacune des séquences d'acide nucléique rétroviral est disposée sous la forme d'hybrides d'expression individuels à l'intérieur du BAC.

20 Selon un autre aspect de l'invention, on propose le BAC tel que défini dans le présent fascicule pour une utilisation dans un procédé de production de particules de vecteur rétroviral.

25 Selon encore un autre aspect de l'invention, on propose un procédé de production d'une particule de vecteur rétroviral défectif en réplication, comprenant :

30 (a) l'introduction du BAC tel que défini dans le présent document dans une culture de cellules hôtes mammifères ; et

(b) la culture des cellules hôtes mammifères dans des conditions permettant de produire la particule de vecteur rétroviral défectif en réplication.

5 Selon encore un autre aspect de l'invention, on propose une particule de vecteur rétroviral défectif en réplication obtenue par le procédé tel que défini dans le présent fascicule.

10 BREVE DESCRIPTION DES FIGURES

FIGURE 1 : Guide étape par étape pour la construction de BACpack-WTGP-277delU5 et de BACpack-SYNGP-277delU5.

15 FIGURE 2 : Comparaison des titres viraux obtenus dans l'exemple 2.  $10^6$  cellules HEK293T ont été ensemencées dans une plaque à 6 puits. Le jour suivant, les cellules ayant adhéré ont été transfectées en utilisant la PEI selon les instructions des fabricants. Les puits ont été transfectés soit avec un total de 4  $\mu$ g d'hybrides d'emballage de lentivirus de type sauvage (WT) constitué de pMDL.gp 20 (GagPol), pMD.G (VSVg), pK-Rev (Rev) et pCCL.277 (vecteur de transfert GFP) soit avec 2  $\mu$ g de BACpack (un unique hybride BAC contenant GagPol, VSVg et Rev) plus 2  $\mu$ g du vecteur de transfert eGFP sur un plasmide séparé.

25 48 heures après la transfection, le surnageant a été récolté, filtré à travers un filtre de 0,22  $\mu$ m et stocké à -80°C pendant un minimum de 4 heures. Les cellules HEK293T ont été ensemencées pour la transduction à  $10^5$  cellules par puits dans une plaque à 24 puits. Le jour suivant, le surnageant viral a été appliqué sur les cellules dans des 30 dilutions en série avec Polybrene à une concentration finale de 8  $\mu$ g/ml. 3 jours après la transduction, les cellules ont été récoltées par traitement à la trypsine et

analysées au niveau de la GFP par FACS. Le titre viral a été calculé en unités de transduction (TU)/ml, calculées selon l'équation suivante :

5 (cellules GFP positives/100) x facteur de dilution x nombre de cellules transduites.

Les titres viraux ont été comparés sur le diagramme en bâtons. Toutes les incubations ont été réalisées à 37°C et à 5 % de CO<sub>2</sub>. Les milieux utilisés ont été du DMEM supplémenté avec du FBS à 10 % et 1 µg/ml de doxycycline dans 10 l'échantillon BACpack + transfert.

FIGURE 3 : Transfection transitoire de BACpack dans des cellules HEK293T adhérentes.

Des cellules HEK293T ont été transfectées 15 transitoirement avec BACpackWTGP-277delU5, BACpackSYN-277delU5 ou le système à 4 plasmides standard en utilisant le procédé au phosphate de calcium. 16 heures après la transfection, les conditions +Dox ont été induites pendant 24 heures avec 1 µg/ml de doxycycline. Le surnageant viral a été 20 récolté 48 heures après la transfection, filtré à travers un filtre de 0,22 µm et titré par transduction des cellules HEK293T. Les cellules transduites GFP positives ont été utilisées pour calculer les unités de transduction/ml (TU/ml).

25

DESCRIPTION DETAILLÉE DE L'INVENTION

DEFINITIONS

Sauf stipulation contraire, tous les termes techniques et scientifiques utilisés dans le présent fascicule ont la 30 même signification que celle communément admise par l'homme du métier dont fait partie la présente invention.

Le terme « comprenant » englobe « y compris » ou « constitué », par exemple une composition « comprenant » X peut se composer exclusivement de X ou peut inclure quelque chose de plus, par exemple X + Y.

5 Le terme « constitué essentiellement de » limite l'étendue de la caractéristique aux matières ou étapes spécifiées et à celles qui n'affectent pas matériellement les caractéristiques basiques de la caractéristique revendiquée.

10 Le terme « constitué de » exclut la présence de tout composant additionnel.

Le terme « environ » en relation avec une valeur numérique x signifie par exemple  $x \pm 10\%$ , 5 %, 2 % ou 1 %.

15 Le terme « vecteur » ou « vecteur d'acide nucléique » désigne un véhicule qui est capable de porter artificiellement un matériel génétique étranger (à savoir exogène) dans une autre cellule, où il peut être répliqué et/ou exprimé. Les exemples de vecteurs comprennent les vecteurs d'acide nucléique non mammifère, comme les chromosomes artificiels bactériens (BAC), les chromosomes artificiels 20 artificiels de levure (YAC), les chromosomes artificiels dérivés de P1 (PAC), les cosmides ou les fosmides.

25 Les autres exemples de vecteurs comprennent les vecteurs viraux comme les vecteurs rétroviraux et lentiviraux, qui sont d'un intérêt particulier dans la présente demande. Les vecteurs lentiviraux, comme ceux à base du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1), sont largement utilisés puisqu'ils sont capables de s'intégrer dans des cellules non prolifératives. Les vecteurs viraux peuvent être rendus défectifs en

réPLICATION EN CASSANT LEUR GÉNOME VIRAL EN PARTIES SÉPARÉES, PAR EXEMPLE EN LE PLAÇANT SUR DES PLASMIDES SÉPARÉS. PAR EXEMPLE, CE QUE L'ON APPELLE LA PREMIÈRE GÉNÉRATION DE VECTEURS LENTIVIRAUX, DÉVELOPPÉE PAR LE SALK 5 INSTITUTE FOR BIOLOGICAL STUDIES, A ÉTÉ CONSTRUISTE SOUS LA FORME D'UN SYSTÈME D'EXPRESSION À TROIS PLASMIDES CONSTITUÉ D'UNE CASSETTE D'EXPRESSION D'EMBALLAGE, DE LA CASSETTE D'EXPRESSION D'ENVELOPPE ET DE LA CASSETTE D'EXPRESSION DU VECTEUR. LE « PLASMIDE D'EMBALLAGE » CONTIENT LA TOTALITÉ 10 DES SÉQUENCES *gag-pol*, LES SÉQUENCES RÉGULATRICES (*tat* ET *rev*) ET ACCESSOIRES (*vif*, *vpr*, *vpu*, *nef*). LE « PLASMIDE D'ENVELOPPE » CONTIENT LA GLYCOPROTEINE DU VIRUS DE LA STOMATITE VÉSICULAIRE (VSVg) EN SUBSTITUTION DE LA PROTÉINE D'ENVELOPPE DU VIH-1 NATIVE, SOUS LE CONTRÔLE D'UN 15 PROMOTEUR DU CYTOMÉGALOVIRUS (CMV). LE TROISIÈME PLASMIDE (LE « PLASMIDE DE TRANSFERT ») PORTE LES RÉPÉTITIONS TERMINALES LONGUES (LTR), LA SÉQUENCE D'ENCAPSULATION ( $\Psi$ ), LA SÉQUENCE ÉLÉMENT DE RÉPONSE REV (RRE) ET LE PROMOTEUR CMV AFIN D'EXPRIMER LE TRANSGÈNE À L'INTÉRIEUR DE LA 20 CELLULE HÔTE.

LA DEUXIÈME GÉNÉRATION DE VECTEURS LENTIVIRAUX A ÉTÉ CARACTÉRISÉE PAR LA DÉLÉTION DES SÉQUENCES DE VIRULENCE *vpr*, *vif*, *vpu* ET *nef*. LE VECTEUR D'EMBALLAGE A ÉTÉ RÉDUIT AUX GÈNES *gag*, *pol*, *tat* ET *rev*, ACCROISSANT PAR CONSÉQUENT 25 LA SÛRETÉ DU SYSTÈME.

POUR AMÉLIORER LE SYSTÈME LENTIVIRAL, LES VECTEURS DE TROISIÈME GÉNÉRATION ONT ÉTÉ CONÇUS EN ÉLIMINANT LE GÈNE *tat* DE L'HYBRIDE D'EMBALLAGE ET EN INACTIVANT LES LTR DE LA CASSETTE DU VECTEUR, CE QUI A donc RÉDUIT LES PROBLÈMES 30 RELATIFS AUX EFFETS DE LA MUTAGENÈSE INSERTIONNELLE.

LES DIFFÉRENTES GÉNÉRATIONS DE LENTIVIRUS SONT DÉCRITES DANS LES RÉFÉRENCES SUIVANTES : Première

génération : Naldini et al. (1996) *Science* 272(5259) : 263-7 ; Deuxième génération : Zufferey et al. (1997) *Nat. Biotechnol.* 15(9) : 871-5 ; Troisième génération : Dull et al. (1998) *J. Virol.* 72(11) : 8463-7. Un récapitulatif du 5 développement des vecteurs lentiviraux se trouve dans Sakuma et al. (2012) *Biochem. J.* 443(3) : 603-18 et Picanço-Castro et al. (2008) *Exp. Opin. Therap. Patents* 18(5) :525-539.

Le terme « origine de réPLICATION non mammifère » désigne une séquence d'acide nucléique où la réPLICATION est 10 initiée et qui est dérivée d'une source non mammifère. Cela permet aux vecteurs d'acide nucléique de l'invention de se réPLiquer de manière stable et de se ségréger aux côtés des chromosomes endogènes dans une cellule hôte appropriée (par exemple une cellule microbienne, comme une cellule 15 bactérienne ou de levure) de manière à être transmissibles à la descendance de la cellule hôte, sauf si la cellule hôte est une cellule hôte mammifère. Dans les cellules hôtes mammifères, les vecteurs d'acide nucléique ayant des origines de réPLICATION non mammifères seront soit intégrés dans les 20 chromosomes endogènes de la cellule hôte mammifère, soit perdus lors de la réPLICATION de la cellule hôte mammifère. Par exemple, les vecteurs d'acide nucléique ayant des origines de réPLICATION non mammifères comme les chromosomes artificiels bactériens (BAC), le chromosome artificiel dérivé 25 de P1 (PAC), les cosmides ou fosmides, sont capables de se réPLiquer de manière stable et de se ségréger aux côtés des chromosomes endogènes dans des cellules bactériennes (comme *E. coli*), mais s'ils sont introduits dans des cellules hôtes mammifères, le BAC, PAC, cosmid ou fosmid sera soit 30 intégré, soit perdu lors de la

réPLICATION de la cellule hôte mammifère. Les chromosomes artificiels de levure (YAC) sont capables de se répliquer de manière stable et de se ségréger aux côtés des chromosomes endogènes dans des cellules de levure, mais 5 s'ils sont introduits dans des cellules hôtes mammifères, les YAC seront soit intégrés, soit perdus lors de la réPLICATION de la cellule hôte mammifère. Par conséquent, dans ce contexte, les vecteurs d'acide nucléique de l'invention font office de réservoirs d'ADN (c'est-à-dire 10 pour les gènes essentiels à la production rétrovirale) qui peuvent être facilement transférés dans des cellules de mammifères afin de générer des particules de vecteurs rétroviraux. Les exemples d'origines de réPLICATION non mammifères comprennent : les origines de réPLICATIONS 15 bactériennes, comme *oriC*, *oriV* ou *oriS* ; les origines de réPLICATION virales, comme l'origine de réPLICATION SV40 ; ou les origines de réPLICATION de la levure connues sous le nom de séquences de réPLICATION autonome (éléments ARS).

Les vecteurs d'acide nucléique de la présente 20 invention comprennent une origine de réPLICATION non mammifère et sont capables de contenir au moins 25 kilobases (kb) d'ADN. Dans un mode de réalisation, le vecteur d'acide nucléique possède la capacité de contenir au moins 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 25 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340 ou 350 kb d'ADN. Il est bien entendu que les références à la « capacité de contenir » ont leur sens usuel et impliquent que la limite supérieure pour la taille 30 de l'insert pour le vecteur d'acide nucléique n'est pas inférieure à la taille revendiquée (c'est-à-dire n'est pas inférieure à 25 kb d'ADN).

Le but de la présente invention est d'inclure les gènes essentiels à l'emballage rétroviral dans un unique hybride (c'est-à-dire le vecteur d'acide nucléique). Par conséquent, les vecteurs d'acide nucléique de l'invention 5 doivent être capable de contenir de gros inserts d'ADN. Pour éviter tout doute, il est bien entendu que les références à des « vecteurs d'acide nucléique » ou « chromosomes artificiels » ne se rapportent pas à des plasmides bactériens naturels (par exemple comme les 10 plasmides actuellement utilisés dans les procédés de transfection transitoire) car ils ne sont pas capables de contenir au moins 25 kb d'ADN. L'insert de taille maximale qu'un plasmide peut contenir est environ 15 kb. Ces vecteurs d'acide nucléique ne désignent également pas des 15 bactériophages, lesquels ne contiennent en général que des inserts maximaux de 5 à 11 kb. Par conséquent, dans un mode de réalisation, le vecteur d'acide nucléique de l'invention n'est pas un plasmide, ni un bactériophage, ni un épisome.

Le terme « chromosomes endogènes » désigne des 20 chromosomes génomiques se trouvant dans la cellule hôte avant la génération ou l'introduction d'un vecteur d'acide nucléique exogène, comme un chromosome artificiel bactérien.

Les termes « transfection », « transformation » et 25 « transduction », tels qu'utilisés dans le présent fascicule, peuvent être utilisés pour décrire l'insertion du vecteur non mammifère ou viral dans une cellule cible. L'insertion d'un vecteur est usuellement appelée transformation pour les cellules bactériennes et 30 transfection pour les cellules eucaryotes, bien que l'insertion d'un vecteur viral puisse aussi être nommée transduction. L'homme du métier connaîtra les différents

procédés de transfection non virale communément utilisés, qui comprennent mais sans y être limités l'utilisation de procédés physiques (par exemple électroporation, compression cellulaire, sonoporation, transfection optique, 5 fusion de protoplaste, impaléfection, magnétofection, pistolet à gène ou bombardement de particules), de réactifs chimiques (par exemple phosphate de calcium, composés organiques fortement ramifiés ou polymères cationiques) ou lipides cationiques (par exemple lipofection). Plusieurs 10 procédés de transfection nécessitent le contact de solutions d'ADN de plasmide avec les cellules qui sont ensuite cultivées.

Le terme « promoteur » désigne une séquence qui entraîne l'expression génique. Afin d'entraîner un haut 15 niveau d'expression, il peut être bénéfique d'utiliser un promoteur fortement efficace, comme un promoteur non rétroviral fortement efficace. Les exemples de promoteurs appropriés peuvent comprendre un promoteur tel que le promoteur précoce immédiat du cytomégalovirus (CMV) humain, 20 le promoteur SFFV (spleen focus-forming virus), le promoteur du virus du sarcome de Rous (RSV) ou le promoteur du facteur 1-alpha d'elongation humain (pEF).

Le terme « signal polyA » désigne une séquence signal de polyadénylation, par exemple en place 3' d'un transgène, 25 qui permet à des facteurs hôtes d'ajouter une queue polyadénosine (polyA) à la fin de l'ARNm naissant lors de la transcription. La queue polyA est un étirement allant jusqu'à 300 ribonucléotides d'adénosine qui protège l'ARNm de la dégradation enzymatique et facilite également la 30 traduction. Par conséquent, les vecteurs d'acide nucléique de la présente invention peuvent inclure une séquence signal polyA comme les signaux polyA de la bêta globine

humaine ou de la bêta globine du lapin, les signaux polyA précoces ou tardifs du virus simien 40 (SV40), le signal polyA de l'insuline humaine, ou le signal polyA de l'hormone de croissance bovine. Dans un mode de 5 réalisation, la séquence signal polyA est le signal polyA de bêta globine humaine.

Le terme « séquence d'intron » désigne une séquence de nucléotide qui est retirée du produit génique final par épissage de l'ARN. L'utilisation d'un intron en aval de la 10 région de l'activateur/du promoteur et en amont de l'insert d'ADNc s'est révélée accroître le taux d'expression du gène. La hausse de l'expression dépend en particulier de l'insert d'ADNc. Par conséquent, le vecteur d'acide nucléique de la présente invention peut comprendre des 15 introns comme l'intron de la bêta globine humaine, l'intron II de la bêta globine du lapin, ou un intron de bêta globine humaine-immunoglobine chimérique. Dans un mode de réalisation, l'intron est un intron de la bêta globine humaine et/ou un intron II de la bêta globine du lapin.

20 Le terme « lignée cellulaire d'emballage » désigne une lignée cellulaire qui est capable d'exprimer la protéine gag et pol et des gènes de la glycoprotéine d'enveloppe. En variante, le terme « lignée cellulaire productrice » désigne une lignée cellulaire d'emballage qui est aussi 25 capable d'exprimer un vecteur de transfert contenant un transgène d'intérêt.

Le terme « transfecté transitoirement » désigne des cellules transfectées où les acides nucléiques cibles (c'est-à-dire les gènes rétroviraux) ne sont pas incorporés 30 de manière permanente dans le génome cellulaire. Par conséquent, les effets des acides nucléiques à l'intérieur de la cellule ne durent qu'un laps de temps court.

## VECTEURS D'ACIDE NUCLEIQUE

Selon un aspect de l'invention, on propose un vecteur d'acide nucléique comprenant une origine de réplication non 5 mammifère et ayant la capacité de contenir au moins 25 kilobases (kb) d'ADN, caractérisé en ce que ledit vecteur d'acide nucléique comprend des séquences d'acide nucléique rétroviral codant pour :

les protéines gag et pol, et  
10 une protéine env ou un substitut fonctionnel de celle-ci.

En particulier, chacune des séquences d'acide nucléique rétroviral peut être disposée sous la forme d'hybrides d'expression individuels à l'intérieur du 15 vecteur d'acide nucléique.

Les présents inventeurs ont découvert que les vecteurs d'acide nucléique décrits dans le présent document pouvaient être utilisés pour produire des particules de vecteur rétroviral qui éliminent les difficultés 20 antérieures liées aux procédés de production des vecteurs rétroviraux. Par exemple, en incluant la totalité des gènes rétroviraux essentiels dans le vecteur d'acide nucléique, les gènes rétroviraux peuvent être ensuite introduits dans une cellule hôte de mammifère en une seule étape. Par 25 conséquent, l'utilisation d'un vecteur d'acide nucléique, telle que proposée dans le présent document, permet une production de vecteurs plus rapide et réduit la quantité de matériel requise pour la production des vecteurs rétroviraux.

30 Dans un mode de réalisation, le vecteur d'acide nucléique comprend, en plus, des séquences d'acide nucléique qui codent pour l'ARN génomique d'une particule

de vecteur rétroviral. Il est bien entendu que l'ARN génomique de la particule de vecteur rétroviral est usuellement inclus sur le « vecteur de transfert » utilisé dans les procédés de transfection transitoire. Le plasmide 5 du vecteur de transfert contient un promoteur (comme CMV), la LTR 3' (qui peut être ou ne pas être une LTR 3' à auto-inactivation (c'est-à-dire SIN), la LTR 5' (qui peut contenir ou ne pas contenir la région U5), la séquence d'encapsidation ( $\psi$ ) et potentiellement, le transgène lié à 10 un promoteur.

Dans un mode de réalisation, des copies multiples de l'ARN génomique de la particule de vecteur rétroviral (c'est-à-dire le vecteur de transfert) sont incluses dans le vecteur d'acide nucléique. On s'attend à ce que de 15 multiples copies du vecteur de transfert produisent un titre de vecteur viral plus élevé. Par exemple, le vecteur d'acide nucléique peut comprendre deux copies ou plus, comme trois, quatre, cinq, six, sept, huit, neuf ou dix copies ou plus de l'ARN génomique de la particule de 20 vecteur rétroviral (c'est-à-dire du vecteur de transfert).

Dans un mode de réalisation, le vecteur d'acide nucléique contient un site ou une pluralité de sites de recombinaison. L'enzyme recombinase catalyse la réaction de recombinaison entre deux sites de recombinaison.

25 Plusieurs types des systèmes de recombinaison spécifique à un site sont connus dans l'art et tout système de recombinaison approprié peut être utilisé dans la présente invention. Par exemple, dans un mode de réalisation, le ou les sites de recombinaison sont choisis 30 ou dérivés du système *int/att* du phage lambda, du système *Cre/lox* du bactériophage P1, du système FLP/FRT de la levure, du système recombinase *Gin/gix* du phage Mu, du

système recombinase Cin, du système recombinase Pin de *E. coli* et du système R/RS du plasmide pSR1, ou de toute combinaison de ceux-ci. Dans un autre mode de réalisation, le site de recombinaison est un site *att* (par exemple provenant du phage lambda), où le site *att* permet une intégration orientée en présence d'une intégrase lambda. Il est bien entendu que la référence à l'intégrase lambda comprend les références aux intégrases mutantes qui sont toujours compatibles avec le système *int/att*, par exemple les intégrases lambda modifiées, décrites dans le document 10 WO 2002/097059.

Dans un mode de réalisation, le vecteur d'acide nucléique est choisi parmi : un chromosome artificiel bactérien (BAC), un chromosome artificiel de levure (YAC), 15 un chromosome artificiel dérivé de P1 (PAC), un fosmide ou un cosmide. Dans un mode de réalisation préféré, le vecteur d'acide nucléique est un chromosome artificiel bactérien (BAC).

20 *Chromosomes artificiels bactériens*

Selon un aspect de l'invention, on propose un chromosome artificiel bactérien (BAC), caractérisé en ce que ledit BAC comprend des séquences d'acide nucléique rétroviral codant pour :

25 les protéines gag et pol, et

une protéine env ou un substitut fonctionnel de celle-ci

dans lequel chacune des séquences d'acide nucléique rétroviral est disposée sous la forme d'hybrides 30 d'expression individuels à l'intérieur du BAC.

Le terme « chromosome artificiel bactérien » ou « BAC » désigne un ADN hybride dérivé de plasmides

bactériens qui est capable de contenir un gros insert d'ADN exogène. Ils peuvent en général contenir un insert d'ADN maximal d'environ 350 kb. Les BAC ont été développés à partir du plasmide de la fertilité fonctionnelle bactérienne bien caractérisé (plasmide F) qui contient des gènes de répartition qui favorisent la distribution régulière des plasmides après la division cellulaire bactérienne. Cela permet aux BAC d'être répliqués de manière stable et de subir une ségrégation aux côtés des génomes bactériens endogènes (comme *E. coli*). Le BAC contient usuellement au moins une copie d'une origine de réplication (comme le gène *oriS* ou *oriV*), le gène *repE* (pour la réplication du plasmide et la régulation du nombre de copies) et des gènes de répartition (comme *sopA*, *sopB*, *parA*, *parB* et/ou *parC*), ce qui garantit le maintien stable du BAC dans les cellules bactériennes. Les BAC sont naturellement circulaires et super-enroulés, ce qui les rend plus faciles à récupérer que les chromosomes artificiels linéaires comme les YAC. Ils peuvent être aussi introduits dans des cellules hôtes bactériennes relativement facilement, en utilisant des procédés simples tels que l'électroporation.

Dans un mode de réalisation, le chromosome artificiel bactérien comprend un gène *oriS*. Dans un mode de réalisation, le chromosome artificiel bactérien comprend un gène *repE*. Dans un mode de réalisation, le chromosome artificiel bactérien comprend des gènes de répartition. Dans un autre mode de réalisation, les gènes de répartition sont choisis parmi *sopA*, *sopB*, *parA*, *parB* et/ou *parC*. Dans encore un autre mode de réalisation, le chromosome artificiel bactérien comprend un gène *sopA* et *sopB*.

Le BAC pour une utilisation dans la présente invention peut être obtenu auprès de sources commerciales, par exemple le BAC pSMART de LUCIGEN™ (voir n° d'entrée du Génome EU101022.1 pour la séquence squelette complète). Ce 5 BAC contient le système « copie-plus » du L-arabinose qui contient également l'origine de réPLICATION de copie du milieu *oriV*, qui est active seulement en présence de la protéine de réPLICATION TrfA. Le gène pour TrfA peut être incorporé dans le génome des cellules hôtes bactériennes 10 sous le contrôle du promoteur inductible du L-arabinose *araC-P<sub>BAD</sub>* (voir Wild et al. (2002) *Genome Res.* 12(9) : 1434-1444). L'addition du L-arabinose induit l'expression de TrfA, qui active *oriV*, ce qui provoque une réPLICATION du plasmide pouvant aller jusqu'à 50 copies par cellule.

15

#### *Chromosomes artificiels de la levure*

Le terme « chromosome artificiel de la levure » ou « YAC » désigne des chromosomes dans lesquels l'ADN de la levure est incorporé dans des plasmides bactériens. Ils 20 contiennent une séquence de réPLICATION autonome (ARS) (c'est-à-dire une origine de réPLICATION), un centromère et des télomères. Au contraire des BAC, le YAC est linéaire et contient donc des télomères de levure à chaque extrémité du chromosome afin de protéger ses extrémités de la 25 dégradation puisqu'il se transmet à la descendance de la cellule hôte. Les YAC peuvent contenir une gamme de tailles d'insert ADN, à peu près de 100 à 2000 kb.

#### *Chromosomes artificiels dérivés de P1*

30 Le terme « chromosome artificiel dérivé de P1 » ou « PAC » désigne des ADN hybrides dérivés de l'ADN du bactériophage P1 et du plasmide F bactérien. Ils peuvent

contenir usuellement un insert d'ADN maximal d'environ 100 à 300 kb et sont utilisés comme vecteurs de clonage dans *E. coli*. Les PAC présentent des avantages similaires aux BAC, comme celui de se purifier facilement et de pouvoir 5 s'introduire dans des cellules hôtes bactériennes.

#### *Cosmides et fosmides*

Le terme « cosmide » désigne des ADN hybrides dérivés de plasmides bactériens qui contiennent, en plus, des sites 10 *cos* dérivés du bactériophage lambda. Les cosmides contiennent en général une origine de réPLICATION bactérienne (comme *oriV*), un marqueur de sélection, un site de clonage et au moins un site *cos*. Les cosmides peuvent usuellement accepter un insert d'ADN maximal de 40 à 45 kb. 15 Les cosmides se sont avérés être plus efficaces dans l'infection des cellules de *E. coli* que les plasmides bactériens standards. Le terme « fosmides » désigne des vecteurs d'acide nucléique non mammifère qui sont similaires aux cosmides sauf qu'ils sont à base du plasmide 20 F bactérien. En particulier, ils utilisent l'origine de réPLICATION du plasmide F et des mécanismes de répartition qui permettent le clonage de gros fragments d'ADN. Les fosmides peuvent usuellement accepter un insert d'ADN maximal de 40 kb.

25

#### RETROVIRUS

Les rétrovirus sont une famille de virus qui contiennent un ARN génomique simple brin pseudo-diploïde. Ils codent pour une transcriptase inverse qui produit de 30 l'ADN à partir de l'ARN génomique, qui peut être ensuite inséré dans l'ADN de la cellule hôte. L'invention décrite dans le présent document peut être utilisée pour produire

des particules de vecteur rétroviral défectif en réplication. La particule de vecteur rétroviral de la présente invention peut être choisie parmi ou dérivée de tout rétrovirus approprié.

5 Dans un mode de réalisation, la particule de vecteur rétroviral est dérivée ou choisie parmi un lentivirus, un alpha-rétrovirus, un gamma-rétrovirus ou un rétrovirus mousseux, comme un lentivirus ou un gamma-rétrovirus, en particulier un lentivirus. Dans un autre mode de 10 réalisation, la particule de vecteur rétroviral est un lentivirus choisi dans le groupe constitué du VIH-1, VIH-2, VIS, VIF, VAIIE et Visna. Les lentivirus sont capables d'infecter des cellules qui ne se divisent pas (c'est-à-dire quiescentes), ce qui en fait des vecteurs rétroviraux 15 intéressants pour la thérapie génique. Dans encore un autre mode de réalisation, la particule de vecteur rétroviral est le VIH-1 ou est dérivée du VIH-1. La structure génomique de certains rétrovirus peut se trouver dans l'art. Par exemple, des détails sur le VIH-1 peuvent se trouver auprès 20 de la GenBank NCBI (n° d'entrée du Génome n° AF033819). Le VIH-1 est l'un des rétrovirus les mieux compris et est par conséquent souvent utilisé comme vecteur rétroviral.

#### *Gènes rétroviraux*

25 Les séquences d'acide nucléique communes à tous les rétrovirus peuvent être expliquées plus en détail comme suit :

Répétitions terminales longues (LTR) : la structure basique d'un génome de rétrovirus comprend une LTR 5' et 30 une LTR 3' entre ou à l'intérieur desquelles sont situés les gènes nécessaires à la production rétrovirale. Les LTR sont nécessaires pour l'intégration et la transcription

rétrovirales. Elles peuvent aussi faire office de séquences promoteurs pour réguler l'expression des gènes rétroviraux (ce qui veut dire que ce sont des gènes à action *cis*). Les LTR sont composées de trois sous-régions nommées U3, R, 5 U5 : U3 est dérivée de la séquence unique à l'extrémité 3' de l'ARN, R est dérivée d'une séquence répétée aux deux extrémités de l'ARN ; et U5 est dérivée de la séquence unique à l'extrémité 5' de l'ARN. Par conséquent, dans un mode de réalisation, le vecteur d'acide nucléique comprend 10 en plus une LTR 5' et 3'. Dans un autre mode de réalisation, la région U5 de la LTR 5' peut être déletée et remplacée par une queue polyA non VIH-1 (voir Hanawa et al. (2002) *Mol. Ther.* 5(3) : 242-51).

Afin de régler les problèmes de sécurité concernant la 15 génération de virus compétents en réplication, un vecteur à auto-inactivation (SIN) a été développé par déletion d'une section dans la région U3 de la LTR 3', qui comprend la boîte TATA et des sites de liaison pour les facteurs de transcription Spl et NF- $\kappa$ B (voir Miyoshi et al. (1998) *J. Virol.* 72(10) :8150-7). La déletion est transférée à la LTR 20 5' après transcription inverse et intégration dans des cellules infectées, ce qui aboutit à l'inactivation transcriptionnelle de la LTR. Ceci est connu comme étant un système de vecteur à base de lentivirus à auto-inactivation 25 qui peut être inclus dans la présente invention.

$\Psi$  : L'encapsidation des ARN rétroviraux se produit en vertu d'une séquence  $\Psi$  (psi) située au niveau de l'extrémité 5' du génome rétroviral. Il est aussi bien connu dans l'art que les séquences en aval de la séquence 30 psi et s'étendant dans la région codante *gag* sont impliquées dans la production efficace de vecteurs rétroviraux (voir Cui et al. (1999) *J. Virol.* 73(7) : 6171-

6176). Dans un mode de réalisation, le vecteur d'acide nucléique comprend en plus une séquence  $\psi$  (psi).

Site de liaison à l'amorce (PBS) : Le génome rétroviral contient un PBS qui est présent après la région 5 U5 de la LTR 5'. Ce site se lie à l'amorce d'ARNt nécessaire pour l'initiation de la transcription inverse. Dans un mode de réalisation, le vecteur d'acide nucléique comprend en plus une séquence PBS.

PPT : Les génomes rétroviraux contiennent de courts 10 étirements de purines, appelés tractus de polypurine (PPT) près de l'extrémité 3' du génome rétroviral. Ces PPT font office d'amorces d'ARN pour la synthèse de l'ADN à plus de brins au cours de la transcription inverse. Les rétrovirus complexes (tels que le VIH-1) contiennent un deuxième PPT 15 localisé plus au centre (c'est-à-dire un tractus polypurine central (cPPT)) qui fournit un deuxième site pour l'initiation de la synthèse de l'ADN. Les vecteurs rétroviraux codant pour un cPPT se sont avérés avoir une transduction et une expression du transgène améliorées 20 (voir Barry *et al.* (2001) *Hum. Gene Ther.* 12(9) :1103-8). Dans un mode de réalisation, le vecteur d'acide nucléique comprend en plus une séquence PPT en 3' et/ou une séquence cPPT.

La structure génomique des régions non codantes 25 décrites ci-dessus est bien connue de l'homme du métier. Par exemple, des détails sur la structure génomique des régions non codantes dans le VIH-1 peuvent se trouver dans la base de données GenBank NCBI, au n° d'entrée du Génome AF033819, ou pour HXB2 du VIH-1 (une souche de référence du 30 VIH-1 communément utilisée) au n° d'entrée du Génome K03455. Dans un mode de réalisation, les régions non codantes sont dérivées des séquences disponibles sous le n°

d'entrée du Génome K03455, par exemple à partir des paires de bases 454-1126 (pour R-U5-PBS-Gag), 7622-8479 (pour RRE) ou 7769-8146 (pour RRE), 4781-4898 (pour cPPT), 9015-9120 & 9521-9719 (pour dNEF-PPT-sinU3-R-U5).

5 *Gag/pol* : L'expression des gènes *gag* et *pol* est basée sur un décalage de traduction du cadre de lecture entre *gag* et *gagpol*. Les deux sont des polyprotéines qui sont clivées au cours de la maturation. Les protéines structurelles majeures de matrice, capsidé et nucléocapsidé du vecteur rétroviral, sont codées par *gag*. Le gène *pol* code pour les enzymes rétrovirales : i) transcriptase inverse, essentielle pour la transcription inverse de l'ARN génomique rétroviral en un ADN double brin, ii) intégrase, qui permet l'intégration de l'ADN génomique rétroviral dans un chromosome de la cellule hôte, et iii) protéase qui clive la polyprotéine synthétisée afin de produire les protéines matures et fonctionnelles du rétrovirus. Dans un mode de réalisation, la séquence d'acide nucléique rétroviral codant les protéines *gag* et *pol* est dérivée de 10 la séquence HXB2 du VIH-1, qui est disponible au n° 15 d'entrée du Génome K03455, par exemple à partir des paires de bases 790-5105.

Env : Le gène *env* (« enveloppe ») code pour la surface et les composants transmembranaires de l'enveloppe rétrovirale (par exemple glycoprotéines gp120 et gp41 du VIH-1) et est impliqué dans la fusion membranaire de la cellule rétrovirale. Afin d'élargir le tropisme des tissus du vecteur rétroviral, les vecteurs rétroviraux décrits ici peuvent être pseudotypés avec une protéine d'enveloppe 20 provenant d'un autre virus. Le pseudotypage désigne le procédé par lequel la gamme des cellules hôtes des vecteurs rétroviraux, y compris des vecteurs lentiviraux, peut être 25

étendue ou modifiée en changeant les glycoprotéines (GP) sur les particules de vecteur rétroviral (par exemple en utilisant les GP obtenues ou dérivées d'autres virus à enveloppe ou en utilisant des GP synthétiques/artificielles).

5 La glycoprotéine la plus communément utilisée pour le pseudotypage des vecteurs rétroviraux est la GP du virus de la stomatite vésiculaire (VSVg), du fait de son large tropisme et de la haute stabilité de ses particules de vecteur. Cependant, il est bien compris par l'homme du métier 10 que d'autres glycoprotéines peuvent être utilisées pour le pseudotypage (voir Cronin et al. (2005) *Curr. Gene Ther.* 5(4) :387-398). Le choix du virus utilisé pour le pseudotypage peut aussi dépendre du type de cellule et/ou 15 d'organe à cibler car certains pseudotypes se sont révélés avoir des préférences pour un type de tissus.

Dans un mode de réalisation, la protéine env ou un substitut fonctionnel de celle-ci est obtenue ou dérivée d'un virus choisi parmi un vésiculovirus (par exemple virus de la stomatite vésiculaire), un lyssavirus (par exemple virus de 20 la rage, virus Mokola), un arénavirus (par exemple virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV)), un alphavirus (par exemple virus de la Ross River (RRV), virus Sindbis, virus de la forêt de Semliki (SFV), virus de l'encéphalite équine vénézuélienne), un filovirus (par exemple le virus Ebola de 25 Reston, le virus Ebola du Zaïre, le virus de Lassa), un alpharétrovirus (par exemple le virus de la leucose aviaire (ALV)), un bétarétrovirus (par exemple le rétrovirus du mouton de Jaagsiekte (JSRV)), un gammaretrovirus (par exemple le virus de la leucémie murine de Moloney (MLV), le virus de 30 la leucémie du singe Gibbon

(GALV), le rétrovirus endogène félin (RD114)), un deltarétrovirus (par exemple un virus T-lymphotrophe humain 1 (HTLV-1)), un spumavirus (par exemple virus mousseux humain), un lentivirus (par exemple virus de Maedi-visna (MVV)), un coronavirüs (par exemple SARS-CoV), un respirovirus (par exemple virus de Sendai, virus syncytial respiratoire (RSV)), un hépacivirus (par exemple le virus de l'hépatite C (VHC)), un virus de la grippe (par exemple virus de la grippe A) et un nucléopolyhédrovirus (par exemple, le nucléopolyhédrovirus multiple *Autographa californica* (AcMNPV)). Dans un autre mode de réalisation, la protéine *env* ou un substitut fonctionnel de celle-ci est obtenue ou dérivée du virus de la stomatite vésiculaire. Dans ce mode de réalisation, la protéine de glycoprotéine du virus de la stomatite vésiculaire (VSVg) peut être utilisée, laquelle permet aux particules rétrovirales d'infecter une gamme de cellules hôtes plus large et d'éliminer les chances de recombinaison afin de produire des protéines d'enveloppe de type sauvage. Dans un autre mode de réalisation, la séquence d'acide nucléique codant la protéine *env* ou un substitut fonctionnel de celle-ci est dérivée de la séquence disponible au n° d'entrée du Génome n° J02428.1, par exemple à partir des paires de bases 3071 à 4720.

25 Les gènes structurels décrits dans le présent document sont communs à tous les rétrovirus. D'autres gènes auxiliaires peuvent être trouvés dans différents types de rétrovirus. Par exemple, les lentivirus, comme le VIH-1, contiennent six autres gènes auxiliaires connus sous le nom 30 de *rev*, *vif*, *vpu*, *vpr*, *nef* et *tat*. D'autres rétrovirus peuvent avoir des gènes auxiliaires qui sont analogues aux gènes décrits dans le présent document, mais ils peuvent ne

pas être toujours indiqués sous le même nom que dans la littérature. Des références telles que Tomonaga et Mikami (1996) *J. Gen. Virol.* 77 (Pt 8) : 1611-1621 décrivent divers gènes auxiliaires de rétrovirus.

5 *Rev* : Le gène auxiliaire *rev* (« régulateur de virion ») code pour une protéine accessoire qui se lie à l'élément de réponse Rev (RRE) et facilite l'exportation des transcrits rétroviraux. Le produit protéique du gène permet aux fragments d'ARNm rétroviral contenant l'élément 10 de réponse Rev (RRE) d'être exportés depuis le noyau dans le cytoplasme. La séquence RRE est prédictive pour former une structure pliée complexe. Ce rôle particulier de *rev* reflète un couplage serré des étapes d'épissage et d'exportation nucléaire. Dans un mode de réalisation, le 15 vecteur d'acide nucléique comprend une séquence RRE. Dans un autre mode de réalisation, la séquence RRE est dérivée de la séquence HXB2 du VIH-1 qui est disponible au n° d'entrée du Génome n° K03455, par exemple à partir des paires de bases 7622 à 8479 ou 7769 à 8146, en particulier 20 des paires de bases 7622 à 8479.

Rev se lie à RRE et facilite l'exportation des transcrits viraux mono-épissés (*env*, *vif*, *vpr* et *vpu*) ou non épissés (*gag*, *pol* et ARN génomique), provoquant ainsi des événements en aval comme la traduction et l'emballage 25 des gènes (voir Suhasini and Reddy (2009) *Curr. HIV Res.* 7(1) : 91-100). Dans un mode de réalisation, le vecteur d'acide nucléique comprend en plus le gène auxiliaire *rev* ou un gène analogue à celui-ci (c'est-à-dire provenant d'autres rétrovirus ou un système analogue 30 fonctionnellement). L'inclusion du gène *rev* garantit l'exportation efficace des transcrits d'ARN du génome de vecteur rétroviral depuis le noyau jusqu'à dans le

cytoplasme, en particulier si un élément RRE est aussi inclus dans le transcrit à transporter. Dans un autre mode de réalisation, le gène *rev* comprend une identité de séquence d'au moins 60 %, comme d'au moins 70 %, avec les 5 paires de bases 970 à 1320 du n° d'entrée du Génome M11840 (c'est-à-dire l'ADNc du clone 12 du VIH-1, le locus HIVPCV12). Dans un mode de réalisation alternatif, le gène *rev* comprend une identité de séquence d'au moins 60 %, comme d'au moins 70 %, 80 %, 90 % ou 100 % avec les paires 10 de bases 5970 à 6040 et 8379 à 8653 du n° d'entrée du Génome K03455.1 (c'est-à-dire du virus de l'immunodéficience humaine de type 1, HXB2).

On pense que les gènes auxiliaires jouent un rôle dans la réplication rétrovirale et la pathogenèse, par 15 conséquent, plusieurs systèmes de production de vecteurs viraux actuels ne comprennent pas certains de ces gènes. L'exception est *rev* qui est usuellement présent ou un système analogue au système *rev/RRE* est potentiellement utilisé. Par conséquent, dans un mode de réalisation, les 20 séquences d'acide nucléique codant pour un ou plusieurs gènes auxiliaires *vpr*, *vif*, *vpu*, *tat* et *nef*, ou gènes auxiliaires analogues sont interrompues de sorte que lesdits gènes auxiliaires soient retirés de l'ARN génomique de la particule de vecteur rétroviral ou soient incapables 25 de coder des protéines auxiliaires fonctionnelles. Dans un autre mode de réalisation, au moins deux gènes auxiliaires ou plus, trois ou plus, quatre ou plus, ou la totalité des gènes auxiliaires *vpr*, *vif*, *vpu*, *tat* et *nef*, ou gènes auxiliaires analogues sont interrompus de sorte que lesdits 30 gènes auxiliaires soient retirés de l'ARN génomique de la particule de vecteur rétroviral ou soient incapables de coder des protéines auxiliaires fonctionnelles. Le retrait

du gène auxiliaire fonctionnel peut ne pas nécessiter le retrait du gène entier, le retrait d'une partie du gène ou l'interruption du gène sera suffisant.

Il est bien entendu que les séquences d'acide nucléique codant la particule de vecteur rétroviral défectif en réplication peuvent être les mêmes que les gènes de type sauvage du rétrovirus sur lequel est basée la particule de vecteur rétroviral, ou en être dérivées, ce qui veut dire que les séquences peuvent être des versions de séquences génétiquement modifiées ou modifiées par un autre biais, présentes dans le virus de type sauvage. Par conséquent, les gènes rétroviraux incorporés dans les vecteurs d'acide nucléique ou génomes de la cellule hôte peuvent aussi se désigner des versions des gènes de type sauvage optimisées au niveau du codon.

#### COMPOSANTS ADDITIONNELS

Les vecteurs d'acide nucléique de l'invention peuvent comprendre plusieurs composants additionnels. Ces caractéristiques additionnelles peuvent être utilisées pour aider par exemple à stabiliser les transcrits pour la traduction, augmenter le taux d'expression des gènes et mettre en marche/arrêter la transcription des gènes.

Les particules de vecteur rétroviral produites par l'invention peuvent être utilisées dans des procédés de thérapie génique. Par conséquent, dans un mode de réalisation, le vecteur d'acide nucléique comprend un ou plusieurs transgènes. Ce transgène peut être un gène thérapeutiquement actif qui code pour un produit génique qui peut être utilisé pour traiter ou améliorer une maladie cible. Le transgène peut coder par exemple un ARN antisens, un ribozyme, une protéine (par exemple une protéine

suppresseur de tumeur), une toxine, un antigène (qui peut être utilisé pour induire des anticorps ou des lymphocytes T assistants ou des lymphocytes T cytotoxiques) ou un anticorps (comme un anticorps monocaténaire). Dans un mode 5 de réalisation le transgène code pour la bêta globine.

On s'attend à ce que de multiples copies du vecteur de transfert contenant le transgène permettent une hausse du titre du vecteur rétroviral, donc, dans un mode de réalisation, le vecteur d'acide nucléique comprend de 10 multiples copies du transgène, comme deux copies du transgène ou plus, en particulier trois ou plus. Dans certains cas, plus d'un produit génique est nécessaire pour traiter une maladie, par conséquent, dans un autre mode de réalisation, le vecteur d'acide nucléique comprend, en 15 plus, deux transgènes différents ou plus, comme trois ou plus, ou quatre ou plus.

Les références présentes à un « transgène » désignent l'ADN hétérologue ou étranger qui n'est pas présent ou pas suffisamment exprimé dans la cellule hôte d'un mammifère 20 dans laquelle il est introduit. Cela peut inclure, par exemple, le cas où un gène cible n'est pas exprimé correctement dans la cellule hôte mammifère, par conséquent une version corrigée du gène cible est introduite comme transgène. Par conséquent, le transgène peut être un gène 25 d'intérêt thérapeutique potentiel. Le transgène peut avoir été obtenu à partir d'un autre type cellulaire, ou d'une autre espèce, ou préparé par synthèse. En variante, le transgène peut avoir été obtenu à partir d'une cellule hôte, mais lié de manière fonctionnelle à des régions 30 régulatrices qui sont différentes de celles présentes dans le gène natif. En variante, le transgène peut avoir une

allèle différente ou un variant différent d'un gène présent dans la cellule hôte.

Le but de la thérapie génique est de modifier le matériel génétique des cellules vivantes à des fins thérapeutiques, et cela implique l'insertion d'un gène fonctionnel dans une cellule afin d'obtenir un effet thérapeutique. Le vecteur rétroviral produit en utilisant les vecteurs d'acides nucléiques et les cellules hôtes décrits dans le présent document peut être utilisé pour transfacter des cellules cibles et induire l'expression du gène d'intérêt thérapeutique potentiel. Le vecteur rétroviral peut par conséquent être utilisé pour le traitement d'un sujet mammifère, comme un sujet humain, atteint d'une maladie comprenant, mais sans y être limitée, les pathologies héréditaires, le cancer, et certaines infections virales.

Dans un mode de réalisation, le vecteur d'acide nucléique comprend en plus un élément de régulation de la transcription. Par exemple, l'un quelconque des éléments décrits dans le présent document peut être lié de manière fonctionnelle à un promoteur de manière à pouvoir contrôler l'expression. Les promoteurs désignés ici peuvent inclure des promoteurs connus, en tout ou en partie, qui peuvent être constitutivement actifs ou inductibles, par exemple en présence d'une protéine régulatrice. Dans un mode de réalisation, le vecteur d'acide nucléique comprend en plus un promoteur de haute efficacité comme un promoteur CMV. Ce promoteur présente l'avantage de favoriser un haut niveau d'expression des éléments codés sur le vecteur d'acide nucléique non mammifère. Dans un autre mode de réalisation, le promoteur CMV comprend une séquence dérivée de la souche du cytomégalovirus humain AD169. Cette séquence est

disponible sous le n° d'entrée du Génome X17403, par exemple à partir des paires de bases 173731 à 174404.

Dans un mode de réalisation, le vecteur d'acide nucléique comprend en plus un isolant, comme un isolant chromatine. Le terme « isolant » désigne une séquence génétique qui bloque l'interaction entre les promoteurs et les activateurs. Dans un autre mode de réalisation, l'isolant (comme un isolant chromatine) est présent entre chacune des séquences d'acide nucléique rétroviral. Cela aide à prévenir l'interférence du promoteur (c'est-à-dire quand le promoteur d'une unité de transcription influence l'expression d'une unité de transcription adjacente) entre les séquences d'acide nucléique rétroviral adjacentes. On comprendra que si les isolants sont présents dans le vecteur d'acide nucléique entre chacune des séquences d'acide nucléique rétroviral, alors ceux-ci peuvent être disposés sous la forme d'hybrides d'expression individuels à l'intérieur du vecteur d'acide nucléique. Par exemple, chaque séquence codant pour les séquences d'acide nucléique rétroviral possède son propre promoteur et/ou un intron et/ou un signal polyA. Dans un mode de réalisation l'isolant chromatine a une identité de séquence d'au moins 90 %, par exemple d'au moins 95 %, avec la séquence de l'isolant HS4 du poulet (*Gallus gallus*) (par exemple voir n° d'entrée du Génome U78775.2, paires de bases 1 to 1205).

Dans un mode de réalisation, le vecteur d'acide nucléique comprend en plus un signal polyA. L'utilisation d'un signal polyA présente l'avantage de protéger l'ARNm de la dégradation enzymatique et de faciliter la traduction. Dans un mode de réalisation, le signal polyA est obtenu ou dérivé du SV40, de l'hormone de croissance bovine et/ou de la bêta globine humaine. Dans un mode de réalisation, le

signal polyA est dérivé du signal polyA précoce du SV40 (par exemple voir n° d'entrée du Génome EF579804.1, paires de bases 2668 à 2538 à partir du brin moins). Dans un mode de réalisation, le signal polyA est dérivé du signal polyA 5 de la bêta globine humaine (par exemple voir n° d'entrée du Génome GU324922.1, paires de bases 3394 à 4162).

Dans un mode de réalisation, le vecteur d'acide nucléique comprend en plus une séquence d'intron. L'utilisation d'un intron en aval de la région de 10 l'activateur/du promoteur et en amont de l'insert d'ADNC (c'est-à-dire du transgène) est connue pour accroître le taux d'expression de l'insert. Dans un autre mode de réalisation, la séquence d'intron est une séquence d'intron de la bêta globine humaine ou d'intron II de la bêta 15 globine du lapin. Dans un mode de réalisation, l'intron de la bêta globine humaine est dérivé de la séquence disponible sous le n° d'entrée du Génome KM504957.1 (par exemple à partir des paires de bases 476 à 1393). Dans un mode de réalisation, l'intron II de la bêta globine du 20 lapin est dérivé de la séquence disponible sous le n° d'entrée du Génome V00882.1 (par exemple à partir des paires de bases 718 à 1290).

Dans un mode de réalisation, le vecteur d'acide nucléique comprend en plus un élément régulateur de post- 25 transcription du virus de l'hépatite de la marmotte (WPRE). La présence du WPRE s'est révélée renforcer l'expression et, en tant que telle, est susceptible d'être bénéfique dans l'obtention de hauts niveaux d'expression. Dans un autre mode de réalisation, le WPRE est dérivé de la 30 séquence disponible au n° d'entrée du Génome J04514.1 (par exemple à partir des paires de bases 1093 à 1684).

Dans un mode de réalisation, le vecteur d'acide nucléique comprend en plus un site d'entrée dans le ribosome interne (IRES). Un IRES est un élément d'ARN structuré qui se trouve usuellement dans la région non traduite 5' en amont de la coiffe 5' (qui est nécessaire pour l'assemblage du complexe d'initiation). L'IRES est reconnu par des facteurs d'initiation de la traduction et permet la traduction indépendante de la coiffe. Dans un autre mode de réalisation, l'IRES est dérivé du génome du virus de l'encéphalomyocardite (EMCV) (par exemple voir le n° d'entrée du Génome KF836387.1, paires de bases 151 à 724).

Dans un mode de réalisation, le vecteur d'acide nucléique comprend en plus un site de clonage multiple (MCS). Un MCS est un segment court d'ADN à l'intérieur du vecteur d'acide nucléique qui contient de multiples sites de restriction (par exemple 10, 15 ou 20 sites). Ces sites sont usuellement présents seulement une fois à l'intérieur du vecteur d'acide nucléique pour garantir que l'endonucléase ne clive qu'au niveau d'un site. Cela permet aux gènes rétroviraux d'être facilement insérés en utilisant les endonucléases appropriées (c'est-à-dire des enzymes de restriction).

L'homme du métier comprendra que les hybrides peuvent être disposés dans un ordre quelconque à l'intérieur du vecteur d'acide nucléique. Dans un exemple de mode de réalisation, le vecteur d'acide nucléique comprend l'insert suivant : une séquence d'acide nucléique rétroviral codant pour les protéines *gag* et *pol*, une séquence d'acide nucléique rétroviral codant pour la protéine *env* ou un substitut fonctionnel de celle-ci (comme VSVg) et une séquence d'acide nucléique rétroviral codant pour le gène

auxiliaire *rev* (comme une séquence *rev* à codon optimisé) ou une gène analogue à celui-ci ou un système fonctionnellement analogue (c'est-à-dire une séquence BAC conservant GagPol-Env-Rev (« squelette BAC ») ; comme : 5 GagPol-(type sauvage)VSVg-(à codon optimisé) Rev-pSMARTBAC). Dans un autre mode de réalisation, un isolant (comme un isolant chromatine) est présent entre chacune des séquences *gagpol*, *env* et *rev*. Dans un autre mode de réalisation, un promoteur est présent entre chacune des 10 séquences *gagpol*, *env* et *rev*. Dans encore un autre mode de réalisation, au moins une copie de la séquence du vecteur de transfert (c'est-à-dire comprenant les séquences d'acide nucléique qui codent pour l'ARN génomique d'une particule de vecteur rétroviral) est présente avant la séquence 15 *gagpol*.

Dans un mode de réalisation, le vecteur d'acide nucléique comprend l'insert suivant : un isolant (comme un isolant chromatine), un promoteur (comme un promoteur CMV), un intron (comme un intron de bêta globuline humaine), une 20 séquence d'acide nucléique rétroviral codant pour les protéines *gag* et *pol*, un acide nucléique rétroviral codant RRE, un signal polyA (comme un signal polyA de bêta globuline humaine), un isolant (comme un isolant chromatine), un promoteur (comme un promoteur CMV), un 25 intron (comme un intron de bêta globuline humaine), une séquence d'acide nucléique rétroviral codant pour la protéine *env* ou un substitut fonctionnel de celle-ci (comme VSVg), un signal polyA (comme un signal polyA de bêta globuline humaine), un isolant (comme un isolant chromatine), un promoteur (comme un promoteur CMV), une 30 séquence d'acide nucléique rétroviral codant pour le gène auxiliaire *rev* ou un gène analogue à celui-ci ou un système

fonctionnellement analogue, un signal polyA (comme un signal polyA de bêta globuline humaine), un isolant (comme un isolant chromatine), un promoteur (comme un promoteur CMV), un intron (comme un intron de bêta globuline de 5 lapin), un signal polyA et un site de clonage multiple. On comprendra que d'autres séquences peuvent être incluses avec et/ou à l'intérieur de cet insert.

Les séquences d'acide nucléique peuvent être introduites dans le vecteur d'acide nucléique 10 séquentiellement. Cela permet une sélection après chaque intégration afin de garantir que la totalité des séquences d'acide nucléique nécessaires sont intégrées avec succès dans le vecteur d'acide nucléique. En variante, au moins deux séquences d'acide nucléique ou plus sont introduites 15 dans le vecteur d'acide nucléique simultanément.

On comprendra que les gènes additionnels décrits dans le présent document peuvent être introduits dans le vecteur d'acide nucléique par des techniques de clonage moléculaire standards connues dans l'art, par exemple en utilisant les 20 endonucléases de restriction et les techniques de ligation. En outre, le vecteur d'acide nucléique, en particulier les BAC, PAC, fosmides et/ou cosmides, peut être introduit dans des cellules hôtes bactériennes (comme les cellules de *E. coli*, en particulier la souche DH10B de *E. coli*) par des 25 techniques standards, comme l'électroporation.

#### UTILISATIONS

Selon un autre aspect de l'invention, on propose le vecteur d'acide nucléique tel que défini dans le présent 30 fascicule pour une utilisation dans un procédé de production de particules de vecteur rétroviral. Telle que décrite dans le présent document, la présente invention

apporte de multiples avantages pour l'utilisation des vecteurs d'acide nucléique décrits dans les procédés de transfection transitoire, principalement en réduisant le système de transfection à 4 plasmides à un unique vecteur 5 d'acide nucléique, ce qui permet de réduire la quantité de matériel utilisé.

#### PROCEDES

Selon un autre aspect de l'invention, on propose un 10 procédé de production d'une particule de vecteur rétroviral défectif en réplication, comprenant :

(a) l'introduction du BAC tel que défini dans le présent document dans une culture de cellules hôtes mammifères ; et

15 (b) la culture des cellules hôtes mammifères dans des conditions permettant de produire la particule de vecteur rétroviral défectif en réplication.

L'avantage qu'apporte l'inclusion de la totalité des 20 gènes rétroviraux sur un gros vecteur d'acide nucléique est qu'ils peuvent être préparés dans des cellules microbiennes (comme des cellules bactériennes ou de levure) d'abord, lesquelles sont bien plus faciles à utiliser et à manipuler, avant de les introduire dans des cellules 25 mammifères dans une unique étape.

Dans un mode de réalisation, la cellule hôte est une cellule mammifère. Dans un autre mode de réalisation, la cellule mammifère est choisie parmi une cellule HEK 293, une cellule HEK 6E, une cellule CHO, une cellule de Jurkat, 30 une cellule KS62, une cellule PerC6, une cellule HeLa, une cellule HOS, une cellule H9, ou un dérivé ou un équivalent fonctionnel de celles-ci. Dans encore un autre mode de

réalisation, la cellule hôte mammifère est une cellule HEK 293 ou dérivée d'une cellule HEK 293. Ces lignées cellulaires pourraient être des lignées cellulaires adhérentes (c'est-à-dire qu'elles croissent en une monocouche fixée à une surface) ou des lignées cellulaires adaptées/non adhérentes en suspension (c'est-à-dire qu'elles croissent en suspension dans un milieu de culture). Dans encore un autre mode de réalisation, la cellule HEK 293 est une cellule HEK 293T ou une cellule HEK 10 6E. Le terme « cellule HEK 293 » désigne la lignée cellulaire 293 du rein embryonnaire humain qui est communément utilisée en biotechnologie. En particulier, les cellules HEK 293T sont communément utilisées pour la production de divers vecteurs rétroviraux. D'autres 15 exemples de lignées cellulaires appropriées disponibles dans le commerce comprennent les lignées cellulaires T REX™ (Life Technologies).

Les cellules hôtes transduites en utilisant les procédés définis dans le présent document peuvent être 20 utilisées pour produire un titre élevé de vecteur rétroviral.

Les références présentes ici au terme « titre élevé » désigne une quantité efficace d'un vecteur rétroviral ou d'une particule qui est capable de transduire une cellule 25 cible, comme une cellule d'un patient. Dans un mode de réalisation, un titre élevé est un titre excédant  $10^6$  TU/ml sans concentration (TU = unités de transduction).

L'homme du métier saura que l'introduction du vecteur d'acide nucléique dans la cellule hôte peut être réalisée 30 en utilisant des procédés appropriés connus dans l'art, par exemple, la transfection induite par des lipides (lipofection, la micro-injection, la fusion cellulaire

(comme micro-cellulaire), l'électroporation, les procédés de transfection à base chimique ou le bombardement de microparticles. On comprendra que le choix du procédé à utiliser pour l'introduction du vecteur d'acide nucléique puisse dépendre du type de cellule hôte mammifère utilisé. Dans un mode de réalisation, l'étape d'introduction (a) est réalisée en utilisant la lipofection, l'électroporation ou un procédé de transfection à base chimique. Dans un autre mode de réalisation, le vecteur d'acide nucléique est introduit dans la cellule hôte par lipofection. Dans un mode de réalisation alternatif, le vecteur d'acide nucléique est introduit dans la cellule hôte par un procédé de transfection à base chimique, comme le traitement au phosphate de calcium. Les traitements au phosphate de calcium sont disponibles dans le commerce par exemple chez Promega.

L'homme du métier comprendra que les conditions utilisées dans le procédé décrit dans le présent document soient dépendantes de la cellule hôte utilisée. Les conditions typiques, par exemple le milieu de culture ou la température à utiliser, sont bien connues dans l'art (voir Kutner et al. (2009) *Nature Protocols* 4(4) ; 495-505). Dans un mode de réalisation, l'étape de culture (b) est réalisée en incubant la cellule hôte de mammifère dans des conditions humidifiées. Dans un autre mode de réalisation, les conditions humidifiées comprennent l'incubation des cellules transfectées à 37°C à 5 % de CO<sub>2</sub>. Dans un mode de réalisation, l'étape de culture (b) est réalisée en utilisant un milieu de culture choisi parmi le milieu d'Eagle modifié par Dubelcco (DMEM) contenant 10 % (vol/vol) de sérum fœtal de bovin (FBS) ou un milieu UltraCULTURE™ sans sérum (Lonza, n° cat. 12-725F) ou le

milieu d'expression FreeStyle<sup>TM</sup> (Thermo fisher, n° cat. 12338 018).

Dans un mode de réalisation, le procédé comprend en plus l'isolation de la particule de vecteur rétroviral 5 défectif en réplication. Par exemple, dans un mode de réalisation, l'isolation est réalisée en utilisant un filtre. Dans un autre mode de réalisation, le filtre est une membrane de faible liaison aux protéines (par exemple une membrane de faible liaison aux protéines de 0,22 µm ou 10 une membrane de faible liaison aux protéines de 0,45 µm), comme les membranes artificielles de fluorure de polyvinylidène (PVDF) ou de polyéthersulfone (PES).

Dans un mode de réalisation, les particules de vecteur rétroviral défectif en réplication sont isolées moins de 72 15 heures après l'étape d'introduction (a). Dans un autre mode de réalisation, les particules de rétrovirus défectif en réplication sont isolées entre 48 et 72 heures après l'étape d'introduction (a), par exemple au bout de 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 20 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71 ou 72 heures.

Une fois isolées, les particules de vecteur rétroviral peuvent être concentrées pour des applications *in vivo*. Les procédés de concentration comprennent par exemple l'ultracentrifugation, la précipitation ou la 25 chromatographie d'échange anionique. L'ultracentrifugation est utile comme procédé rapide pour la concentration du vecteur rétroviral à petite échelle. En variante, la chromatographie d'échange anionique (utilisant par exemple des cartouches de membrane d'échange anionique Mustang Q) 30 ou la précipitation (par exemple utilisant PEG 6000) sont particulièrement utiles pour la transformation de gros volumes de surnageants de vecteurs lentiviraux.

Selon un autre aspect de l'invention, on propose une particule de vecteur rétroviral défectif en réPLICATION obtenue par le procédé tel que défini dans le présent 5 fascicule.

L'invention va à présent être décrite plus en détails à l'aide des exemples non limitatifs suivants.

10 EXEMPLES

EXEMPLE 1 : Guide de construction d'hybrides

La Figure 1 montre un guide étape par étape pour la construction de BACpack-WTGP-277delU5 et BACpack-SYNGP-277delU5. Grâce aux extrémités compatibles d'un produit de 15 digestion de *Xba*I et *Nhe*I, les gènes d'emballage lentiviraux ont été progressivement chargés dans le vecteur pSmart BAC. Au moment de l'addition de GagPol, 2 hybrides ont été fabriqués, lesquels contiennent soit GagPol de type sauvage (WTGP) soit GagPol à codon optimisé (SYNGP). La 20 nomenclature de BACpack-WTGP et de BACpack-SYNGP leur a été respectivement donnée. La cassette de transfert a été ensuite chargée sur ces deux hybrides, générant ainsi BACpackWTGP-277delU5 et BACpackSYNGP-277delU5.

25 EXEMPLE 2 : Expérience de la preuve de principe en utilisant l'hybride BAC

10<sup>6</sup> cellules HEK293T ont été ensemencées dans une plaque à 6 trous. Le jour suivant, les cellules ayant adhéré ont été transfectées en utilisant la PEI selon les 30 instructions du fabricant. Les cellules ont été ensuite transfectées soit avec un total de 4 µg des hybrides d'emballage lentiviraux de type sauvage (WT) constitué de

pMDL(gp (GagPol), pMD.G (VSVg), pK-Rev (Rev) et pCCL.277 (vecteur de transfert GFP) soit 2 µg de BACpack (un unique hybride BAC contenant GagPol, VSVg et Rev) plus 2 µg du vecteur de transfert eGFP sur un plasmide séparé.

5        48 heures après la transfection, le surnageant a été récolté, filtré à travers un filtre de 0,22 µm et stocké à -80°C pendant un minimum de 4 heures. Les cellules HEK293T ont été ensemencées pour la transduction à 10<sup>5</sup> cellules par puits dans une plaque à 24 puits. Le jour suivant, le 10 surnageant viral a été appliqué aux cellules dans des dilutions en série avec Polybrene à une concentration finale de 8 µg/ml. 3 jours après la transduction, les cellules ont été récoltées par traitement à la trypsine et analysées au niveau de la GFP par FACS. Le titre viral a 15 été calculé en unités de transduction (TU)/ml, calculées selon l'équation suivante :

(cellules GFP positives/100) × facteur de dilution × nombre de cellules transduites.

20        Les titres viraux ont été comparés sur le diagramme en bâtons (Figure 2). Toutes les incubations ont été réalisées à 37°C et à 5 % de CO<sub>2</sub>. Les milieux utilisés ont été du DMEM supplémenté avec du FBS à 10 % et 1 µg/ml de doxycycline dans l'échantillon BACpak + transfert.

Observations :

25        Dans cet exemple, la capacité de l'hybride BACpack, constitué des cassettes d'expression GagPol, VSVg et Rev, a été comparée au système d'emballage à 3 plasmides standards où GagPol, VSVg et Rev sont distribués séparément. Dans les deux cas, le vecteur de transfert a été délivré 30 conjointement dans un plasmide séparé afin de compléter les composants essentiels pour le vecteur viral.

Dans cet exemple, le BACpack plus vecteur de transfert a été capable d'atteindre un titre viral du surnageant non concentré de  $2,2 \times 10^7$  TU/ml, par rapport à un titre de  $5 \times 10^7$  TU/ml quand on utilise un système de lentivirus à 4 plasmides séparés. Bien qu'un titre plus faible ait été observé en utilisant le BACpack, cette analyse a permis une pré-optimisation et un titre plus élevé peut être obtenu post-optimisation.

A partir de cette analyse de preuve de principe, on peut conclure que le BACpack est capable d'emballer le vecteur de transfert à un niveau de titre viral comparable à celui du système de plasmide d'emballage séparé dans une transfection transitoire.

15 EXEMPLE 3 : Transfection transitoire de BACpack dans des cellules HEK293T adhérentes.

Afin de confirmer la capacité des deux hybrides BACpack-277delU5 à produire le vecteur lentiviral dans un système de transfection transitoire, la lignée cellulaire adhérente, HEK293T, utilisée de manière routinière pour produire un vecteur lentiviral par transfection transitoire, ont été transfectées avec soit le système à 4 plasmides d'emballage actuel, soit BACpackWTGP-277delU5 soit BACpackSYNGP-277delU5. Les deux hybrides BACpack-277delU5 ont été soit induits pour évaluer si l'expression génique pouvait résulter dans la production du vecteur lentiviral soit laissés non induits pour tester l'efficacité du système répresseur Tet.

30 Les résultats sur la figure 3 montrent le titre en unités de transduction/ml (TU)/ml du surnageant de vecteur lentiviral récolté à partir de chaque condition de transfection. On peut voir à partir des résultats de

titration que les cellules transfectées soit avec BACpackWTGP-277delU5 soit avec BACpackSYNGP-277delU5 et induites avec 1  $\mu$ g/ml de doxycycline (+Dox) ont produit des concentrations de vecteur lentiviral comparables au système à 4 plasmides actuel. En plus, les conditions non induites ont démontré une capacité grandement réduite à produire le vecteur lentiviral par rapport à celles induites, et bien que cette production ait été supérieure à l'arrière plan témoin non transfecté, cela ne peut être considéré comme un inconvénient dans un système transitoire.

Ces résultats suggèrent que le vecteur BAC unique contenant la totalité des gènes d'emballage nécessaires à la production lentivirale pourrait remplacer le système à 4 plasmides actuel.

15

On comprendra que les modes de réalisation décrits ici peuvent être appliqués à tous les aspects de l'invention.

REVENDICATIONS

1. Chromosome artificiel bactérien (BAC), caractérisé en ce que ledit BAC comprend des séquences d'acide nucléique rétroviral codant pour :

les protéines gag et pol, et  
une protéine env

dans lequel chacune des séquences d'acide nucléique rétroviral est disposée sous la forme d'hybrides d'expression individuels à l'intérieur du BAC.

2. Chromosome artificiel bactérien selon la revendication 1, qui comprend en outre des séquences d'acide nucléique qui codent pour l'ARN génomique d'une particule de vecteur rétroviral.

3. Chromosome artificiel bactérien selon la revendication 1 ou la revendication 2, qui comprend en outre le gène auxiliaire rev.

4. Chromosome artificiel bactérien selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, dans lequel les séquences d'acide nucléique rétroviral sont dérivées d'un rétrovirus choisi parmi les lentivirus, les alpha-rétrovirus, les gamma-rétrovirus ou les rétrovirus mousseux.

5. Chromosome artificiel bactérien selon la revendication 4, dans lequel les séquences d'acide nucléique rétroviral sont dérivées d'un lentivirus choisi dans le groupe constitué du VIH-1, VIH-2, VIS, VIF, VAIE et Visna.

6. Chromosome artificiel bactérien selon la revendication 5, dans lequel les séquences d'acide nucléique rétroviral sont dérivées du VIH-1.

5 7. Chromosome artificiel bactérien selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, dans lequel la protéine env ou un substitut fonctionnel de celle-ci est dérivée du virus de la stomatite vésiculaire.

10 8. Chromosome artificiel bactérien selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, qui comprend en outre un élément régulateur de transcription.

15 9. Chromosome artificiel bactérien selon la revendication 8, dans lequel l'élément régulateur de transcription est un promoteur CMV.

20 10. Chromosome artificiel bactérien selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, qui comprend en outre un isolant.

25 11. Chromosome artificiel bactérien selon la revendication 10, dans lequel un isolant est présent entre chacune des séquences d'acide nucléique rétroviral.

12. Chromosome artificiel bactérien selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, qui comprend en outre un ou plusieurs transgènes.

30 13. Chromosome artificiel bactérien selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, qui comprend en outre un site d'entrée dans le ribosome interne (IRES).

14. Chromosome artificiel bactérien selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, qui comprend en outre un signal polyA.

5 15. Chromosome artificiel bactérien selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, qui comprend en outre une séquence d'intron.

10 16. Chromosome artificiel bactérien selon l'une quelconque des revendications 1 à 15, qui comprend en outre un site de clonage multiple (MCS).

15 17. Chromosome artificiel bactérien selon l'une quelconque des revendications 1 à 16 pour une utilisation dans un procédé de production de particules de vecteur rétroviral.

18. Procédé de production d'une particule de vecteur rétroviral défectif en réplication, comprenant :

20 (a) l'introduction du chromosome artificiel bactérien selon l'une quelconque des revendications 1 à 16 dans une culture de cellules hôtes mammifères ; et

25 (b) la culture des cellules hôtes mammifères dans des conditions permettant de produire la particule de vecteur rétroviral défectif en réplication.

19. Procédé selon la revendication 18, dans lequel la cellule hôte mammifère est une cellule HEK 293.

30 20. Procédé selon la revendication 18 ou la revendication 19, dans lequel l'étape d'introduction (a) est réalisée en utilisant la lipofection, l'électroporation ou un

dé de transfection à base chimique, comme le traitement au phosphate de calcium.

21. Procédé selon l'une quelconque des revendications 18  
5 à 20, dans lequel l'étape de culture (b) est réalisée par incubation de la cellule hôte mammifère dans des conditions humidifiées.

22. Procédé selon l'une quelconque des revendications 10 18 à 21, comprenant en outre l'isolation de la particule de vecteur rétroviral défectif en réplication.

23. Procédé selon la revendication 22, dans lequel 15 l'isolation est réalisée en utilisant un filtre, comme une membrane de faible liaison aux protéines.

24. Procédé selon la revendication 22 ou la revendication 23, dans lequel les particules de vecteur rétroviral défectif en réplication sont isolées moins de 72 20 heures après l'étape d'introduction (a).

25. Procédé selon la revendication 24, dans lequel les particules de vecteur rétroviral défectif en réplication sont isolées entre 48 et 72 heures après l'étape d'introduction 25 (a).

26. Particule de vecteur rétroviral défectif en réplication obtenue par le procédé selon l'une quelconque des revendications 18 à 25.

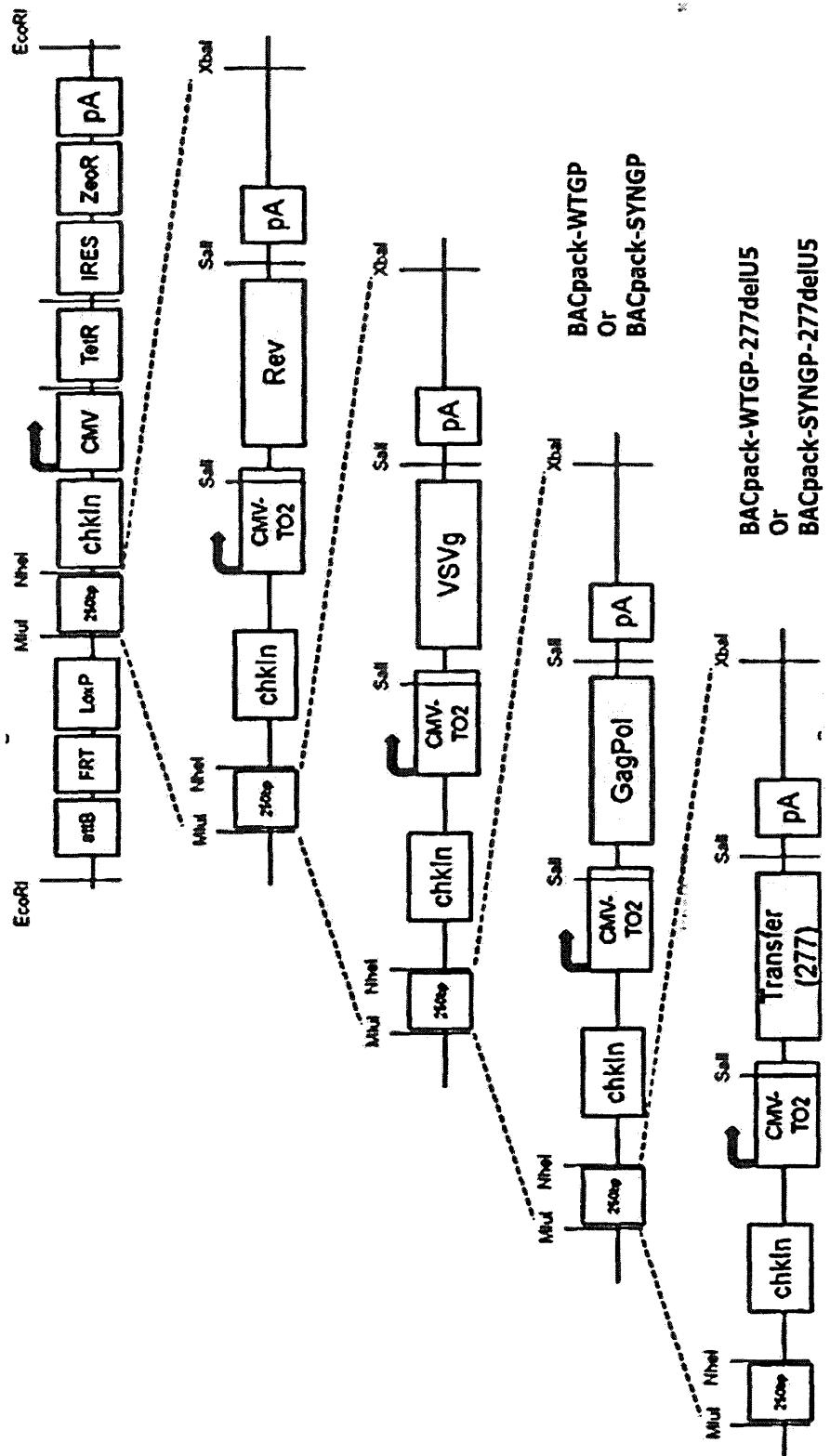
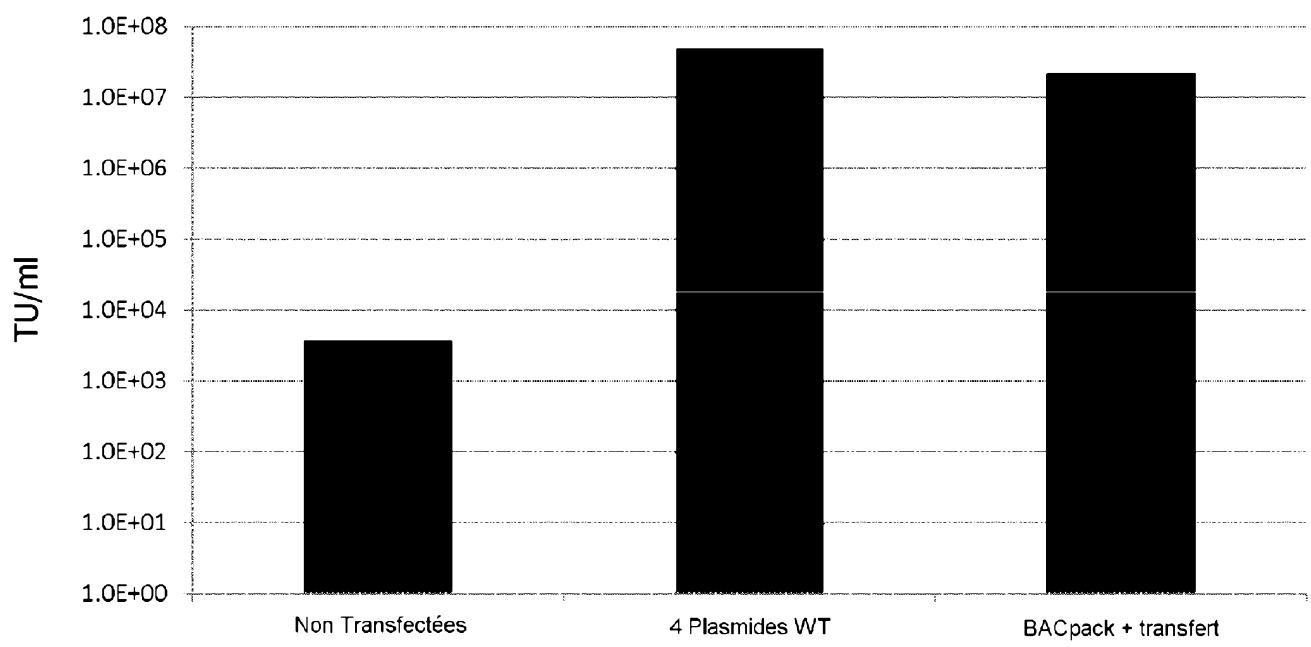


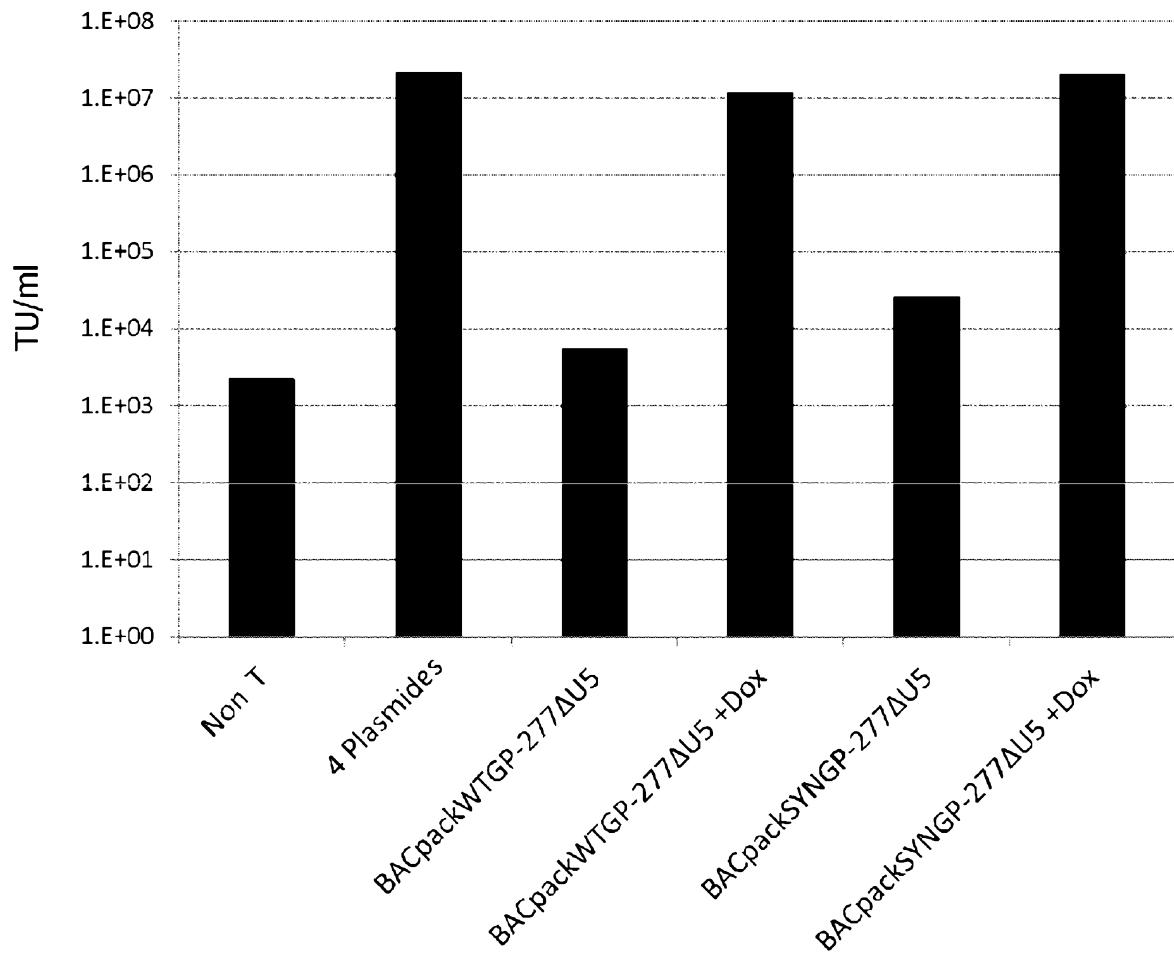
FIGURE 1

2/3



**FIGURE 2**

3/3



**FIGURE 3**

# RAPPORT DE RECHERCHE

articles L.612-14, L.612-53 à 69 du code de la propriété intellectuelle

## OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

L'I.N.P.I. annexe à chaque brevet un "RAPPORT DE RECHERCHE" citant les éléments de l'état de la technique qui peuvent être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention, au sens des articles L. 611-11 (nouveauté) et L. 611-14 (activité inventive) du code de la propriété intellectuelle. Ce rapport porte sur les revendications du brevet qui définissent l'objet de l'invention et délimitent l'étendue de la protection.

Après délivrance, l'I.N.P.I. peut, à la requête de toute personne intéressée, formuler un "AVIS DOCUMENTAIRE" sur la base des documents cités dans ce rapport de recherche et de tout autre document que le requérant souhaite voir prendre en considération.

## CONDITIONS D'ETABLISSEMENT DU PRESENT RAPPORT DE RECHERCHE

Le demandeur a présenté des observations en réponse au rapport de recherche préliminaire.

Le demandeur a maintenu les revendications.

Le demandeur a modifié les revendications.

Le demandeur a modifié la description pour en éliminer les éléments qui n'étaient plus en concordance avec les nouvelles revendications.

Les tiers ont présenté des observations après publication du rapport de recherche préliminaire.

Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

## DOCUMENTS CITES DANS LE PRESENT RAPPORT DE RECHERCHE

La répartition des documents entre les rubriques 1, 2 et 3 tient compte, le cas échéant, des revendications déposées en dernier lieu et/ou des observations présentées.

Les documents énumérés à la rubrique 1 ci-après sont susceptibles d'être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention.

Les documents énumérés à la rubrique 2 ci-après illustrent l'arrière-plan technologique général.

Les documents énumérés à la rubrique 3 ci-après ont été cités en cours de procédure, mais leur pertinence dépend de la validité des priorités revendiquées.

Aucun document n'a été cité en cours de procédure.

**1. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE SUSCEPTIBLES D'ETRE PRIS EN  
CONSIDERATION POUR APPRECIER LA BREVETABILITE DE L'INVENTION**

WO 0222663 A2 (MAXYGEN INC [US]; GENETIC THERAPY INC [US];  
Demandeur:Demandeur:MAXYGEN INC [US]; GENETIC THERAPY INC [US]) 21 mars 2002 (2002-03-21)

WO 2006058231 A2 (NANOVECTOR LTD [GB]; KASAHARA NORIYUKI [US]) 01 juin 2006 (2006-06-01)

US 2012121650 A1 (JOHNSTON ROBERT E [US] ET AL.) 17 mai 2012 (2012-05-17)

WO 0039303 A2 (CHIRON CORP [US]) 06 juillet 2000 (2000-07-06)

US 2006057553 A1 (AGUILAR-CORDOVA ESTUARDO [US]) 16 mars 2006 (2006-03-16)

AU 2013205006 A1 (TOCAGEN INC) 16 mai 2013 (2013-05-16)

**2. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE ILLUSTRANT L'ARRIÈRE-PLAN  
TECHNOLOGIQUE GENERAL**

NEANT

**3. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE DONT LA PERTINENCE DEPEND  
DE LA VALIDITE DES PRIORITES**

NEANT