

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 837 799**

51 Int. Cl.:

C12N 15/867 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.02.2013 PCT/EP2013/054104**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.09.2013 WO13127964**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.02.2013 E 13706283 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.10.2020 EP 2820138**

54 Título: **Transducción retroviral mediante el uso de poloxámeros**

30 Prioridad:

29.02.2012 EP 12157461

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

01.07.2021

73 Titular/es:

**HELMHOLTZ ZENTRUM MÜNCHEN -
DEUTSCHES FORSCHUNGSZENTRUM FÜR
GESUNDHEIT UND UMWELT (GMBH) (50.0%)
Ingolstädter Landstrasse 1
85764 Neuherberg, DE y
SIRION BIOTECH GMBH (50.0%)**

72 Inventor/es:

**ANASTASOV, NATASA;
HÖFIG, INES y
THIRION, CHRISTIAN**

74 Agente/Representante:

SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 837 799 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

Transducción retroviral mediante el uso de poloxámeros

5 La presente invención se define por las reivindicaciones. La descripción se refiere a un método para transducir una célula diana, el método que comprende la etapa de poner en contacto una célula diana con un vector retroviral y un poloxámero que tiene un peso molecular de 12,8 kDa a aproximadamente 15 kDa. Además, la invención se refiere al uso de un poloxámero como se define en las reivindicaciones, opcionalmente en combinación con una sustancia policatiónica como se define en la presente descripción, para transducir una célula diana con un vector retroviral y un
10 kit que comprende un vector retroviral, un poloxámero como se define en las reivindicaciones y, opcionalmente, las instrucciones de uso.

Para las modificaciones genéticas de la mayoría de las células, en particular células primarias, la transducción mediada por vectores virales es el método de elección. En particular, se usan vectores retrovirales como, por ejemplo, vectores lentivirales. Aunque la infección lentiviral se usa ampliamente para una transferencia genética superior, muchos tipos de células *in vitro* y las aplicaciones *in vivo* actuales se enfrentan a una alta toxicidad celular. Los vectores lentivirales (LV) pseudotipados con glicoproteínas del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G) se integran de manera estable en los cromosomas de las células tanto proliferantes como no proliferantes (1-3). Las características de seguridad mejoradas, tales como un diseño de empaquetamiento lentiviral de genoma dividido de
15 tercera generación y deleciones en la repetición terminal larga de (LTR) 3' del vector de transferencia, han convertido al LV en el sistema favorito por muchos investigadores (4). De hecho, hoy en día todas las ramas de la investigación biológica usan intensamente los LV como vehículos fiables de transferencia genética. A diferencia de otros sistemas de vectores virales, las células transducidas por lentivirus apenas muestran la activación de las rutas de señales de estrés o cualquier otra alteración fenotípica y, por lo tanto, prometen una multitud de aplicaciones de
20 terapia génica e inmunoterapia (5, 6).

Actualmente, existe una gran variación con respecto a las condiciones óptimas de transducción para la entrega eficiente del gen del LV en las células diana usadas entre los grupos de investigación y los grupos clínicos (7). Se conoce que los linfocitos normales y los tumores primarios, así como también las líneas celulares del linaje linfocítico, son difíciles de transfectar de manera eficiente (8, 9). Las altas tasas de transferencia genética a las células primarias y la capacidad de producir altos títulos de partículas virales para la transducción a gran escala de células de
25 pacientes son requisitos previos para los ensayos clínicos. Dado que la producción a gran escala de estos virus es extremadamente compleja y costosa (10), cada mejora de las tasas de transducción lentiviral conducirá a una reducción en la necesidad de producción de virus y contribuirá además a reducir los costos de los ensayos clínicos. Se puede lograr una mayor eficiencia de la transferencia genética mediante diferentes estrategias: La concentración de sobrenadantes de virus mediante ultracentrifugación (11) o mediante ultrafiltración (8) es una forma posible de mejorar la eficiencia de la transferencia genética. Otra estrategia usada con frecuencia para mejorar las tasas de transferencia genética es la suplementación de diferentes agentes, tales como los policationes o liposomas catiónicos. Sin embargo, la mayoría de estos tratamientos adyuvantes son tóxicos para las células, lo que limita su uso con
30 células diana sensibles de origen primario (10). Entre otros candidatos, el polibreno (un polímero policatiónico lineal) mejoró las tasas de transducción genética en una amplia gama de células diana y se convirtió en un adyuvante líder en el campo (12, 13). Desafortunadamente, el polibreno solo puede usarse en tiempos de aplicación cortos y en concentraciones menores, por debajo de 10 mg/ml (dependiendo del tipo de célula diana), para evitar la toxicidad celular en el potencial transmembrana (14) que limita su uso en células sensibles, como las células hematopoyéticas.

45 El problema técnico subyacente a la presente invención fue identificar medios y métodos alternativos y/o mejorados para transducir células con vectores retrovirales.

La solución a este problema técnico se logra al proporcionar las modalidades caracterizadas en las reivindicaciones.

50 En consecuencia, la presente invención se refiere, en una primera modalidad, a un método *in vitro* o *ex vivo* para transducir una célula diana, el método comprende la etapa de poner en contacto una célula diana con un vector retroviral y un poloxámero que tiene un peso molecular de aproximadamente 14,6 kDa, en donde el poloxámero está en un estado fluido, y en donde dicho poloxámero tiene la fórmula $\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_x-(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_z-(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_y\text{H}$, en donde $x + y =$ aproximadamente 265 y $z =$ aproximadamente 50 en promedio, en donde "aproximadamente" se refiere a -10 % a +20 %.

Se describe un método para transducir una célula diana, el método comprende la etapa de poner en contacto una célula diana con un vector retroviral y un poloxámero que tiene un peso molecular de 12,8 kDa a aproximadamente
60 15 kDa.

El término "transducir" en el contexto de la modulación celular mediante el uso de vectores retrovirales es bien conocido en la técnica y no tiene otro significado en la presente descripción. En resumen, el término se refiere al proceso de introducción de material genético en una célula y, opcionalmente, su posterior integración en el genoma de dicha célula a través de un vector retroviral. Dicho material genético comprende o consiste en ARN viral combinado con una o más secuencias de ARN diana (de aquí en adelante referidas como secuencias diana)
65

comprendidas en dicho vector destinado a la integración en el genoma de una célula diana. Los "vectores retrovirales" son bien conocidos en la técnica y se han descrito, por ejemplo, en Retrovirus, Coffin J.M., Hughes S.H., Varmus H.E., Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1997; ISBN-10:0-87969-571-4. En resumen, el ADN retroviral (ADNc) y, opcionalmente, integración en el genoma de una célula diana. Después de la entrada celular, la transcriptasa inversa sintetiza el ADNc viral y el ADNc de la secuencia diana que se circulariza y luego se inserta en el genoma de la célula diana. Si bien los vectores retrovirales pueden ser capaces de replicarse, por razones de seguridad, la mayoría de los vectores retrovirales están diseñados para tener defectos de replicación. Los virus correspondientes aún pueden infectar y entregar el material genético a la célula diana, pero no pueden entrar en el ciclo replicativo sin, por ejemplo, proteínas auxiliares que proporcionen las proteínas virales faltantes para la producción de nuevos viriones. Esto puede lograrse mediante la eliminación o la sustitución de genes necesarios para la replicación y el empaquetamiento del virión. Una forma de hacer defectuosa la replicación de los vectores retrovirales es eliminar los genes *gag*, *pol* y *env* que pueden reemplazarse por un casete de expresión que contiene una secuencia diana para su introducción en el genoma de una célula diana. La Repetición Terminal Larga (LTR) y los elementos ψ se retienen con el fin de permitir la expresión transgénica y el empaquetamiento en cápsidas virales durante la producción del vector. Posiblemente, las secuencias diana comprendidas en un vector, como se define en la presente descripción, que pueden introducirse mediante el método (y uso) de la invención, pueden ser cualquier secuencia, en particular aquellas que permiten la integración en el genoma de la célula diana. Por ejemplo, las secuencias codificantes de proteínas, las secuencias reguladoras de la interferencia de ARN, la expresión de miARN o los virus oncolíticos pueden expresarse en una célula después de la transducción, en donde la proteína puede ser, por ejemplo, un marcador o una proteína terapéuticamente valiosa. El concepto de expresión de una proteína terapéutica después de la integración estable mediante transducción retroviral es, por ejemplo, abarcado por el término "terapia génica" que es bien conocido en la técnica. También, las secuencias diana pueden resultar después de la transducción en la regulación decreciente de proteínas o transcritos de ARN no codificantes (por interferencia de ARN) que tienen un efecto en las células transducidas o en el organismo que recibe las células transducidas. Los microARN (miARN) son pequeñas moléculas funcionales que regulan la estabilidad o la eficiencia de traducción de los ARN mensajeros diana. Sus acciones incluyen la represión de la síntesis de proteínas y la inducción de la degradación de ARNm dirigida (Bartel, DP: MicroARN: reconocimiento de diana y funciones reguladoras. Cell. Enero de 2009; 136(2): 215-233). Aplicaciones adicionales de esta invención comprenden el uso de vectores lentivirus para la generación de líneas celulares que expresan genes estables con fines de investigación y producción de productos terapéuticos.

El término "poner en contacto", como se usa en el contexto del método de la invención, se refiere a poner en contacto una célula diana con un vector retroviral y un poloxámero para que pueda ocurrir el evento de transducción. Las condiciones de contacto que permiten que ocurra el evento de transducción son bien conocidas en la técnica y pueden depender hasta cierto punto de las células diana y del vector viral elegido. Por ejemplo, algunas células diana son más difíciles de transfectar que otras células y pueden necesitar una transición a un medio de cultivo específico antes de que pueda lograrse la transducción con un vector viral. Los métodos y condiciones correspondientes se describen, por ejemplo, en Jacome y otros (Corrección genética mediada por lentivirales de células progenitoras hematopoyéticas y mesenquimales de pacientes con anemia de Fanconi. Mol Ther. Junio de 2009; 17(6): 1083-1092), Chu y otros (Expresión génica eficiente y estable en osteoclastos humanos mediante el uso de un vector lentiviral basado en el VIH-1. DNA Cell Biol. junio de 2008; 27(6): 315-320), o Poczobutt y otros (Las células epiteliales mamarias benignas mejoran el fenotipo transformado de las células de cáncer de mama humano. BMC Cancer. 2010; 10: 373). Las condiciones ilustrativas se describen en la sección de ejemplos. El vector retroviral y el poloxámero pueden añadirse simultáneamente, por ejemplo, como una mezcla, a las células diana o en modo secuencial, siempre que ambos compuestos estén simultáneamente en contacto con la célula diana para permitir la transducción. Preferentemente, la célula diana, el vector retroviral y el poloxámero se ponen en contacto durante al menos 5 horas, tal como al menos 6, al menos 7, al menos 8, más preferido al menos 9, al menos 10, al menos 11 y aún más preferido al menos al menos 12 horas. También se prevén tiempos de contacto más prolongados, tal como al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16 o al menos 24 horas. Se prefiere la adición simultánea del vector retroviral y el poloxámero.

Una "célula diana" de acuerdo con la invención puede ser cualquier célula que se dirija a la transducción con un vector viral. El término "célula", como se usa en relación con la presente invención, puede referirse a una célula única y/o aislada o a una célula que forma parte de una entidad multicelular tal como un tejido, un organismo o un cultivo celular. En otras palabras, el método puede realizarse *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*. La célula es una célula eucariota. Una célula eucariota como se usa en la presente descripción, se refiere a cualquier célula de un organismo eucariota multicelular, incluidas células de animales como vertebrados. Preferentemente, la célula es una célula de mamífero. El término "célula de mamífero", como se usa en la presente descripción, es bien conocido en la técnica y se refiere a cualquier célula perteneciente o derivada de un animal que se agrupa en la clase de mamíferos. En dependencia del objetivo particular a alcanzar mediante la modificación del genoma de una célula de mamífero mediante la transducción de acuerdo con el método de la invención, pueden usarse células de diferentes subclases de mamíferos tales como Prototheria o Theria. Por ejemplo, dentro de la subclase Theria, preferentemente se usan células de animales de la infraclase Eutheria, más preferentemente del orden Primates, Artiodactyla, Perissodactyla, Rodentia y Lagomorpha en el método de la invención. Además, dentro de una especie, puede elegirse una célula para usar en el método de la invención en función del tipo de tejido y/o la capacidad de diferenciarse por igual en función del objetivo a alcanzar mediante la modificación del genoma, mediante la

transducción de una célula diana de acuerdo con el método de la invención. Tres categorías básicas de células, que en principio pueden transducirse con el método de la invención, componen el cuerpo de los mamíferos: células germinales, células somáticas y células madre. Una célula germinal es una célula que da lugar a gametos y, por tanto, es continua a través de las generaciones. Las células madre pueden dividirse y diferenciarse en diversos tipos de células especializadas, así como autorrenovarse para producir más células madre. En los mamíferos hay dos tipos principales de células madre: células madre embrionarias y células madre adultas. Las células somáticas incluyen todas las células que no son gametos, gametocitos o células madre indiferenciadas. Las células de un mamífero también pueden agruparse por su capacidad para diferenciarse. Una célula totipotente (también conocida como omnipotente) es una célula que puede diferenciarse en todos los tipos de células de un organismo adulto, que incluye el tejido placentario, como el cigoto (ovocito fertilizado) y los blastómeros posteriores, mientras que las células pluripotentes, como las células madre embrionarias, no pueden contribuir al tejido extraembrionario como la placenta, pero tienen el potencial de diferenciarse en cualquiera de las tres capas germinales: endodermo, mesodermo y ectodermo. Las células progenitoras multipotentes tienen el potencial de dar lugar a células de múltiples, pero un número limitado de linajes celulares. Además, hay células oligopotentes que pueden convertirse en solo unos pocos tipos de células y células unipotentes (también denominadas a veces células precursoras) que pueden convertirse en un solo tipo de célula. Hay cuatro tipos básicos de tejidos: tejido muscular, tejido nervioso, tejido conjuntivo y tejido epitelial, de los cuales se puede derivar una célula que se usará en el método de la invención, como por ejemplo células madre hematopoyéticas o células madre neuronales. En la medida en que se prevea el uso de células humanas en el método de la invención, dicha célula humana no se obtiene de un embrión humano, en particular no mediante métodos que implican la destrucción de un embrión humano. Por otro lado, las células madre embrionarias humanas están a disposición del experto en la materia, como las tomadas de líneas de células madre embrionarias existentes disponibles comercialmente. En consecuencia, la presente invención puede trabajarse con células madre embrionarias humanas sin necesidad de usar o destruir un embrión humano. Alternativamente, o en lugar de células madre embrionarias humanas, pueden usarse células pluripotentes que se asemejan a células madre embrionarias tales como células madre pluripotentes inducidas (iPS), cuya generación es el estado de la técnica (Hargus G. y otros, 2010, Proc Natl Acad Sci USA, 107: 15921-15926; Jaenisch R. y Young R., 2008, Cell 132: 567-582; Saha K. y Jaenisch R., 2009, Cell Stem Cell 5: 584-595).

El término "poloxámero" es bien conocido en la técnica y se refiere a un copolímero de tribloque no iónico compuesto por una cadena hidrófoba central de polioxiopropileno rodeada por dos cadenas hidrófilas de polioxietileno. El copolímero de bloques puede representarse mediante la siguiente fórmula: $\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_x(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_z(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_y\text{H}$, en donde z es un número entero tal que la base hidrófoba representada por $(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})$ tiene un peso molecular de al menos 2250 Da y x o y es un número entero de aproximadamente 8 a 180 o mayor. Los poloxámeros también se conocen con el nombre comercial de "Pluronics" o "Synperonics" (BASF). Las longitudes de los bloques de polímero pueden personalizarse; como resultado, existen muchos poloxámeros diferentes. Un poloxámero a usar de acuerdo con el método de la invención es un poloxámero que tiene un peso molecular de al menos 12,8 kDa a aproximadamente 15 kDa. Como es evidente a partir de la fórmula general anterior, los poloxámeros que tienen un peso molecular correspondiente pueden componerse al cambiar la longitud de los bloques de polímero que forman un poloxámero. Por ejemplo, dos poloxámeros pueden tener aproximadamente el mismo peso molecular, pero son estructuralmente diferentes, porque un poloxámero puede tener más repeticiones del polímero de bloque hidrófobo y menos repeticiones del polímero de bloque hidrófilo mientras que el otro poloxámero tiene más repeticiones de los polímeros de bloque hidrófilos y menos repeticiones del polímero de bloques hidrófobo. Por ejemplo, z puede estar en el intervalo de 42 a 52, tal como al menos (para cada valor) 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 o al menos 52; y $x + y$ puede estar en el intervalo de 220 a 360, como al menos (para cada valor) 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, o al menos 350. z puede estar en el intervalo de 44 a 50 y $x + y$ puede estar en el intervalo de 235 a 266. De acuerdo con la invención, $x + y$ es aproximadamente 265 y z es aproximadamente 50 en promedio. Como la síntesis de copolímeros de bloques no puede ser precisa, los valores dados anteriormente pueden no ser exactamente alcanzables tras la síntesis y el valor promedio diferirá hasta cierto punto (como se describe en la presente descripción). El poloxámero puede tener un peso molecular de 12,8 a aproximadamente 14,9 kDa, de aproximadamente 13,2 a aproximadamente 14,9 kDa, de aproximadamente 13,4 a aproximadamente 14,9 kDa o de aproximadamente 14,0 a aproximadamente 14,9 kDa, de aproximadamente 14,3 a aproximadamente 14,8 kDa, de aproximadamente 14,5 a aproximadamente 14,7 kDa y de aproximadamente 14,6 kDa. De acuerdo con la invención, el peso molecular es de aproximadamente 14,6 kDa. Como entenderá el experto en la técnica, el método se realizará mediante el uso de una multitud de poloxámeros. Por tanto, el término "poloxámero" como se usa en la presente descripción puede usarse de manera intercambiable con el término "poloxámero" (que representa una entidad de varios poloxámeros, también referida como mezcla de poloxámeros) si no se indica explícitamente de cualquier otra manera. Como se indica en la presente descripción, la síntesis de poloxámeros es inexacta y da como resultado una mezcla de poloxámeros con peso molecular variable. Por tanto, el término "promedio" en relación con el peso molecular de un(unos) poloxámero(s) como se usa en la presente descripción es una consecuencia de la incapacidad técnica para producir poloxámeros que tengan todos la composición idéntica y por tanto el peso molecular idéntico. Por tanto, los poloxámeros que se producen de acuerdo con los métodos del estado de la técnica estarán presentes como una mezcla de poloxámeros, que cada uno muestra una variabilidad en cuanto a su peso molecular, pero la mezcla en su conjunto promedia el peso molecular especificado en la presente descripción. El experto en la técnica está en condiciones de obtener poloxámeros que pueden usarse en el método de la invención. Por ejemplo, BASF y Sigma Aldrich proporcionan poloxámeros como se definen en la presente descripción. Los métodos para determinar el peso molecular son bien conocidos en la

técnica y se describen en libros de texto estándar de química. Experimentalmente, puede usarse cromatografía líquida de alta presión (HPLC) para determinar el peso molecular de un poloxámero.

5 Sorprendentemente, los inventores han descubierto que los poloxámeros, tal como se definen anteriormente en la presente descripción, mejoran significativamente la eficiencia de transducción de vectores retrovirales en células diana adherentes y en suspensión sin afectar esencialmente su viabilidad. En resumen, mediante el uso de vectores lentivirales se pudo demostrar que el poloxámero designado "synperonic F108" ($(HO - [CH_2CH_2O]_x - [CH_2C_2H_4O]_z - [CH_2CH_2O]_y)$ con $x + y = 265,45$ y $z = 50,34$ (19); peso molecular promedio: 14,6 kDa) mostró menos citotoxicidad que el polibreno potenciador de la transducción (1,5-dimetil-1,5-diaza-undeca-metil-polimetobromuro) del estado de la técnica, incluso a concentraciones 100 veces superiores a las del polibreno y eficiencia de transducción mejorada (células HEK293T) (Figura 1, ejemplo 2). Lo más sorprendente es que el efecto potenciador de la transducción del poloxámero usado no se limita a tipos de células específicos. Muchas líneas celulares tumorales establecidas han sido difíciles de infectar hasta la presente invención. Pudo demostrarse que el uso de synperonic F108 (peso molecular promedio de 14,6 kDa que consta de 265 unidades de óxido de etileno (EO) hidrófilo y 50 unidades de óxido de propileno (PO) hidrófobo; definido más abajo) aumentó considerablemente las tasas de infección de las líneas celulares de linfoma difíciles de transfectar. Estos resultados muestran la conveniencia de los poloxámeros como se definen en la presente descripción para usarse como potenciadores de la transducción altamente rentables. Además, y como se muestra más abajo en la presente descripción, las modificaciones adicionales del método descrito anteriormente aumentan aún más la eficiencia de la transducción.

20 En una modalidad preferida del método de la invención, la célula diana es una célula seleccionada del grupo que consiste en un linfocito, una célula tumoral, una célula de linaje linfoide, una célula neuronal, una célula epitelial, una célula endotelial, una célula primaria, una célula madre.

25 El término "célula de linaje linfoide" se refiere a células que están implicadas en la generación de linfocitos y a linfocitos *per se*. El término "linfocito" se refiere a linfocitos pequeños (linfocitos B y T, células plasmáticas) y células asesinas naturales bien conocidas en la técnica. Las células de linaje linfoide incluyen, además, por ejemplo, células dendríticas linfoides, así como también células progenitoras de linfocitos tales como pro-linfocitos, linfoblastos, células progenitoras linfoides comunes.

30 Una "célula tumoral" de acuerdo con la invención y como es bien conocido en la técnica es una célula neoplásica implicada en la formación de tumores benignos, premalignos o malignos. Las células tumorales que son malignas generalmente se refieren como células cancerosas y pueden tener la capacidad de hacer metástasis o diseminarse al tejido vecino. Las células tumorales preferidas son, por ejemplo, células tumorales pancreáticas (tales como, por ejemplo, células AsPC-1 y PANC-1), líneas celulares de linfoma (tales como, por ejemplo, células KARPAS-299, SUDHL-1, SUP-M2 y SR-786) y células de cáncer de mama (tales como, por ejemplo, células MCF7, MDA-MB-361 y T47D).

40 Las "células neuronales" son bien conocidas en la técnica y se refieren a células que son células excitables eléctricamente que transmiten información mediante señalización eléctrica y química. Existen varias células neuronales especializadas como, por ejemplo, neuronas sensoriales y neuronas motoras. Por ejemplo, pueden usarse como células diana células en cesta, células Betz, neuronas espinosas medianas, células Purkinje, células piramidales, células Renshaw, células granulares o células del asta anterior como células diana de acuerdo con la invención. Una "célula tumoral neuronal" es una célula tumoral de origen neuronal, por ejemplo, gliomas, meduloblastomas, astrocitomas y otros cánceres derivados del linaje neuronal. Las líneas celulares de glioma (tales como, por ejemplo, U87 y LN18) pueden usarse en el método de la invención.

50 El término "célula madre" es bien conocido en la técnica y se ha detallado anteriormente en la presente descripción. Las células madre preferidas para usar de acuerdo con el método de la invención son, por ejemplo, células madre embrionarias, células madre pluripotentes inducidas, células madre hematopoyéticas, células madre cancerosas.

55 El término "célula epitelial" es bien conocido en la técnica. Las células epiteliales recubren las cavidades y superficies de las estructuras de todo el cuerpo y también forman muchas glándulas. Los tejidos epiteliales pueden clasificarse en epitelio simple (una célula de espesor) y epitelio estratificado (varias capas de células). Las células epiteliales se clasifican además por su morfología en células epiteliales escamosas, cuboideas, columnares y pseudoestratificadas. Por ejemplo, el estómago y el intestino humanos están revestidos de células epiteliales. Además, las líneas de células epiteliales también incluyen células de carcinoma de mama (tales como, por ejemplo, células MCF7, MDA-MB-361 y T47D) o células de la línea celular HEK293T.

60 El término "célula endotelial" se conoce en la técnica para referirse a las células que recubren la superficie interior de los vasos sanguíneos y no tiene otro significado en la presente descripción. Existen varios tipos diferentes de células endoteliales tales como, por ejemplo, células Ea.hy96, HUVEC y HCAEC.

65 El término "célula primaria", como se usa en la presente descripción, se conoce en la técnica para referirse a una célula que se ha aislado de un tejido y se ha establecido para el crecimiento *in vitro*. Las células correspondientes han sufrido muy pocas, o ninguna, duplicación de la población y, por lo tanto, son más representativas del

componente funcional principal del tejido del que se derivan en comparación con las líneas celulares continuas, lo que representa un modelo más representativo del estado *in vivo*. Los métodos para obtener muestras de diversos tejidos y los métodos para establecer líneas celulares primarias son bien conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Jones y Wise, *Methods Mol Biol.* 1997). Las células primarias para usar en el método de la invención se derivan de, por ejemplo, la sangre, linfomas y tumores epiteliales.

Con respecto a la transducción con vectores virales, particularmente con vectores retrovirales, se considera que las células primarias, linfocitos, células de linaje linfóide y células neuronales son difíciles de transfectar.

En una modalidad más preferida, el linfocito es un linfocito primario y/o la célula tumoral es una célula tumoral hematopoyética, una célula tumoral neuronal o una célula tumoral epitelial.

Preferentemente, la célula tumoral epitelial es de origen tumoral de células de mama. Se sabe en la técnica que la última célula, así como también la célula primaria, el linfocito y la célula de linaje linfóide mencionados anteriormente, son particularmente difíciles de transducir mediante el uso de vectores retrovirales y otros vectores virales que incluyen vectores adenovirales, entre otros. Cuando se ejecuta el método de la invención, las tasas de transducción en dichas células pueden mejorarse significativamente con respecto a los métodos del estado de la técnica que no se han logrado antes de la invención.

En otra modalidad preferida del método de la invención, el vector retroviral es un vector lentiviral.

Un vector lentiviral es un vector basado en un virión de lentivirus, es decir, una subclase de retrovirus que puede integrarse en el genoma de células diana que no se dividen, que es una característica única de los lentivirus tener una región de replicación auto inactivada (SIN) en contraste con otros vectores retrovirales. Los lentivirus se describen en detalle, por ejemplo, en *Retrovirus*, Coffin J.M., Hughes S.H., Varmus H.E., Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1997; ISBN-10:0-87969-571-4; O'Connell R.M., Balazs A.B., Rao D.S., Kivork C., Yang L., Baltimore D. La entrega de vector lentiviral de interleucina-7 humana (hIL-7) a ratones con sistema inmunológico humano (HIS) expande las poblaciones de linfocitos T. *PLoS One.* 6 de agosto de 2010; 5 (8): e12009; Matrai J., Chuah M.K., VandenDriessche T. Avances recientes en el desarrollo y aplicaciones de vectores lentivirales. *Mol Ther.* Marzo de 2010; 18(3): 477-90. Un vector lentiviral puede basarse, por ejemplo, en un lentivirus del grupo de lentivirus bovino, equino, felino, ovino/caprino o primate. Preferentemente, el vector lentiviral se basa en un lentivirus de primates tal como el virus VIH1, VIH2 o VIS. Más preferido, el vector lentiviral se basa en un lentivirus del VIH1. Como sabrá el experto en la materia, la mayoría de los vectores lentivirales (disponibles comercialmente) representan una mezcla de constituyentes virales de diferentes virus y son, por tanto, hasta cierto punto vectores "híbridos". Por ejemplo, un vector lentiviral puede comprender constituyentes de los virus VIH1, VSVg, CMV, WPRE. Por tanto, también se prevén vectores pseudotipados de acuerdo con la invención.

En una modalidad más preferida, el vector lentiviral se pseudotipifica con VSV-G y/o con un fragmento de anticuerpo fusionado a VSV-G, como por ejemplo, CD30-VSVg, CD44-VSVg y EGFR-VSVg.

El término "pseudotipado" en el contexto de vectores virales es bien conocido en la técnica y se describe, por ejemplo, en Bischof y otros (Flexibilidad en la focalización celular mediante pseudotipificación de vectores lentivirales. *Methods Mol Biol.* 2010; 614: 53-68). La pseudotipificación se refiere a la modulación de la especificidad del tipo de célula de un vector viral mediante la integración de proteínas de envoltura viral extrañas. Mediante el uso de este enfoque, el tropismo del hospedero puede alterarse y/o la estabilidad del virus puede disminuirse o aumentarse. Por ejemplo, la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G) puede usarse para pseudotipificar un virus lentiviral como se describe, por ejemplo, en Burns y otros (Vectores retrovirales pseudotipados de la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular: concentración hasta un título muy alto y transferencia génica eficiente en células de mamíferos y no mamíferos. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90(17): 8033-8037). El uso de la VSV-G permite ventajosamente la transducción de una gran variedad de tipos de células, sin embargo, la eficiencia de transducción varía para los tipos de células y es particularmente baja para células difíciles de transducir tales como linfocitos primarios y líneas celulares de linfoma.

Se describe un poloxámero que tiene la fórmula $\text{HO}[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}]_x[\text{CH}_2\text{C}_2\text{H}_4\text{O}]_z[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}]_y$, en donde $x + y = 265,45$ y $z = 50,34$ en promedio; o el poloxámero tiene la fórmula $\text{HO}[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}]_x[\text{CH}_2\text{C}_2\text{H}_4\text{O}]_z[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}]_y$, en donde $x + y = 236,36$ y $z = 44,83$ en promedio.

La fórmula $\text{HO}[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}]_x[\text{CH}_2\text{C}_2\text{H}_4\text{O}]_z[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}]_y$, en donde $x + y = 265,45$ y $z = 50,34$ en promedio, se conoce en la técnica como synperonic F108 y se sintetiza como un granulado blanco con un peso molecular promedio de 14,6 kDa que consta de aproximadamente 265 unidades de óxido de etileno (EO) hidrófilas y aproximadamente 50 unidades de óxido de propileno (PO) hidrófobas. Los copolímeros de bloques se sintetizan mediante la adición secuencial de monómeros de PO y EO en presencia de un catalizador alcalino, iniciada por la polimerización del bloque de PO seguida del crecimiento de cadenas de EO en ambos extremos del bloque de PO. Como la síntesis de copolímeros de bloques no puede ser exacta, las repeticiones de x , y y z se dan como promedios. En consecuencia, y con respecto al término "en promedio", la definición dada anteriormente de synperonic F108 incluye poloxámeros que se desvían de dicha mediana, es decir, incluye poloxámeros que se encuentran dentro de la desviación

estándar de la media (promedio). Esta relación explica su solubilidad particularmente no problemática en agua o tampón fosfato (19). En solución acuosa, se describe que las moléculas de poloxámero individuales llamadas unímeros se autoensamblan como micelas con un núcleo de PO y una cubierta de EO. Como es evidente a partir de los ejemplos, el synperonic F108 se evidencia como un poloxámero ilustrativo que tiene un peso molecular dentro del intervalo definido en la presente descripción para actuar como un potente potenciador de la eficiencia de transducción en células diana, particularmente células diana que se sabe que son difíciles de transfectar.

La fórmula $\text{HO}-[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}]_x-[\text{CH}_2\text{C}_2\text{H}_4\text{O}]_z-[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}]_y$, en donde $x+y = 236,36$ y $z = 44,83$ en promedio, se conoce en la técnica como F98 (Kabanov, A. y otros: Copolímeros de bloque Pluronic para la entrega de genes. *Advances in Genetics*. 2005; 53: 231-261.) y se describe en la presente descripción como synperonic F108. La definición con respecto al término "en promedio" dada para synperonic F108 se aplica también a F98.

En una modalidad preferida adicional del método de la invención, dicha célula diana se pone además en contacto con una o más sustancias policatiónicas seleccionadas del grupo de polímeros policatiónicos o péptidos policatiónicos.

"Polímeros policatiónicos" de acuerdo con la presente invención se refiere a polímeros cargados cuyas unidades repetidas llevan una carga positiva, en donde la carga positiva en una unidad repetida proviene de restos de nitrógeno protonados. Por ejemplo, en la polietilénimina (PEI), el grupo cargado positivamente es el grupo imina.

El término "péptidos policatiónicos" se refiere a péptidos cargados positivamente. Por ejemplo, poli-L-lisina es un péptido policatiónico homopolimérico con la fórmula molecular de $(\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O})_n$, en donde de acuerdo con la invención, pero sin limitación, n puede ser al menos 2, al menos 20, preferentemente entre 200 y 500, más preferida entre 500 y 2500.

De acuerdo con la invención, una o más de dichas sustancias policatiónicas pueden ponerse en contacto con la célula diana. Dicho contacto puede efectuarse antes, concomitantemente o después de que la célula diana se haya puesto en contacto con el vector retroviral y dicho poloxámero, siempre que todos los últimos componentes estén eventualmente presentes al mismo tiempo para contactar simultáneamente con la célula diana.

Si más de una sustancia policatiónica como al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos 5 o al menos 6 sustancias policatiónicas se ponen en contacto adicionalmente con la célula diana, pueden pertenecer a polímeros policatiónicos o péptidos policatiónicos, o pueden elegirse entre ambos, es decir, los polímeros policatiónicos pueden mezclarse con péptidos policatiónicos. Sin estar ligado a una teoría específica, se sugiere que todas las sustancias policatiónicas mencionadas en este documento son capaces de tender un puente sobre la repulsión electrostática entre los vectores retrovirales y las células diana y, por tanto, pueden mejorar aún más la eficiencia de la transducción.

En una modalidad más preferida, dichos polímeros policatiónicos se seleccionan del grupo que consiste en copolímero de bloques de poli(etilenglicol)-poli(L-lisina) (PEG-PLL) y 1,5-dimetil-1,5-diaza-undeca-metilpolimetobromuro (Polibreno); y/o dichos péptidos policatiónicos se seleccionan del grupo que consiste en sulfato de protamina y poli-L-lisina (PLL) que tienen un peso molecular medio de 1 a 300 kDa.

El término "copolímero de bloque de poli(etilenglicol)-poli(L-lisina) (PEG-PLL)" se refiere a macromoléculas cargadas positivamente con la fórmula molecular de $[\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}]_x-[\text{C}_2\text{H}_4\text{O}]_y\text{H}_2\text{O}$, en donde $x = 48$ y $y = 272,72$ que corresponde a un peso molecular promedio para el poli(etilenglicol) (PEG) de 12 000 Da. El PEG-PLL se sintetiza como describen Harada y otros *Macromolecules* 1995; 28: 5294-5299].

El PEG-PLL puede usarse solo o, en combinación con cualquiera de: polibreno, sulfato de protamina y/o poli-L-lisina. Posiblemente, se usará cualquier sustancia policatiónica en concentraciones que esencialmente no afecten a la viabilidad celular. Por ejemplo, la concentración de trabajo generalmente aceptada para el polibreno es de 8 a 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Como es evidente a partir de la sección de ejemplos, la combinación de un poloxámero como se define en la presente descripción y polibreno, mejoró aún más la velocidad de transducción en comparación con la mejora demostrada para dicho poloxámero solo (ver ejemplo 6, Figura 5) de una manera aditiva.

En una modalidad aún más preferida, las sustancias policatiónicas son 1,5-dimetil-1,5-diaza-undeca-metilpolimetobromuro y/o sulfato de protamina.

El 1,5-dimetil-1,5-diaza-undeca-metil-polimetobromuro y el sulfato de protamina pueden usarse solos o en combinación entre sí y/o con otras sustancias policatiónicas.

En una modalidad preferida del método de la invención, dicho poloxámero se proporciona a una concentración de aproximadamente 50 a 5000 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

El término "aproximadamente" como se usa en el contexto de la presente descripción se refiere a una desviación promedio de máximo +/- 20 %, preferentemente +/- 10 %. De acuerdo con la invención, "aproximadamente" significa

de -10 % a +20 %. También se prefiere una concentración de aproximadamente 100 a 4000 µg/ml, aproximadamente 200 a 3000 µg/ml, aproximadamente 300 a 2000 µg/ml, aproximadamente 400 a 1500 µg/ml o 450 a 1250 µg/ml.

Los poloxámeros como se definen en la presente descripción se disuelven preferentemente en agua, tampón fosfato o directamente en medio de cultivo celular. Los poloxámeros pueden disolverse, por ejemplo, en agua o tampón fosfato para obtener soluciones madre de 100 mg/ml que pueden diluirse a una concentración de trabajo determinada. A concentraciones de más de 200 mg/ml, las soluciones de poloxámero tienen forma de gel. A concentraciones inferiores a 200 mg/ml, las soluciones de poloxámero se encuentran en estado fluido. Preferentemente, las concentraciones son tales que el poloxámero se proporciona en estado fluido.

En una modalidad más preferida, dicho poloxámero se proporciona a una concentración de aproximadamente 500 a 1000 µg/ml.

También se prefieren concentraciones de aproximadamente 600 a 1000 µg/ml, 700 a 1000 µg/ml, 800 a 1000 µg/ml o 900 a 1000 µg/ml. A las últimas concentraciones, los poloxámeros como se definen en la presente descripción están en un estado fluido cuando se diluyen en agua o tampón fosfato. Como entenderá el experto en la materia, la transducción de células con poloxámeros fluidos puede ser prácticamente más conveniente ya que, por ejemplo, permite un manejo conveniente tal como un pipeteo más fácil.

En otra modalidad preferida de la invención, el método comprende la etapa adicional de espinocular dicho vector retroviral con dicha célula diana antes, concomitantemente o después de poner en contacto dicha célula diana con dicho poloxámero.

El término "espinocular" se refiere a la inoculación centrífuga de una célula diana con el vector retroviral para asegurar un contacto estrecho para la captación celular de retrovirus. Los protocolos de espinulación son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, para vectores lentivirales en Millington y otros, 2009 (30). Puede ejecutarse una etapa de espinulación antes, concomitantemente o después de poner en contacto dicha célula diana con dicho poloxámero. Preferentemente, la etapa de espinulación se realiza después de poner en contacto la célula diana con el poloxámero.

La etapa de espinulación aumenta aún más las velocidades de transducción logradas con el método de la invención, particularmente en células que son difíciles de transfectar (ver los ejemplos 4 y 6, Figuras 4 y 5).

En otra modalidad, la invención se refiere al uso del poloxámero como se define de acuerdo con la invención, opcionalmente en combinación con una sustancia policatiónica como se define anteriormente en la presente descripción, para transducir una célula diana con un vector retroviral.

Todas las definiciones y combinaciones de las características técnicas relacionadas con poloxámeros, células diana y vectores retrovirales descritas anteriormente en la presente descripción con respecto al método de la invención también se aplican *mutatis mutandis* a esta modalidad. Asimismo, también se prevé una etapa de espinulación.

Otra modalidad de la invención se refiere a un kit que comprende un poloxámero como se define de acuerdo con la invención, un polímero policatiónico y/o un péptido policatiónico como se define en la presente descripción y, opcionalmente, instrucciones de uso.

Las definiciones y combinaciones de características descritas anteriormente en la presente descripción con respecto al polímero policatiónico y/o péptido policatiónico también se aplican *mutatis mutandis* a la célula diana, el polímero policatiónico y/o péptido policatiónico del kit de la invención. El kit puede, opcionalmente, comprender además una célula diana como se define anteriormente en la presente descripción.

En una variación de la modalidad anterior, el kit comprende un vector retroviral, un poloxámero como se define anteriormente en la presente descripción y, opcionalmente, instrucciones de uso.

Los diversos componentes del kit se pueden empaquetar en uno o más recipientes, como uno o más viales. Los viales pueden comprender, además de los componentes, conservantes o tampones para el almacenamiento, medios para el mantenimiento y almacenamiento, por ejemplo, medios de células ES, DMEM, MEM, HBSS, PBS, HEPES, higromicina, puomicina, solución de penicilina-estreptomina, gentamicina, entre otros. Ventajosamente, el kit comprende instrucciones para el uso de los componentes que permiten al experto en la materia trabajar de forma conveniente, por ejemplo, en diversas realizaciones de la invención. Cualquiera de los componentes puede emplearse en un entorno experimental.

Las definiciones y combinaciones de características descritas anteriormente en la presente descripción con respecto al vector retroviral y al poloxámero también se aplican *mutatis mutandis* al vector retroviral y al poloxámero del kit de la invención. Por ejemplo, el vector retroviral puede ser un vector lentiviral que puede o no modificarse adicionalmente tal como, por ejemplo, pseudotipado; el poloxámero puede ser synperonic F108 o F98 como se define anteriormente en la presente descripción.

En una modalidad preferida del kit de la invención, dicho kit comprende además un vector retroviral como se define

en la presente descripción.

Las Figuras muestran:

5 Figura 1:
Ensayo de proliferación celular (WST-1) de células HEK293T incubadas con sustancias de la clase de policationes (a: cloroquina, PEA, dextrano, carbamato de cloresterilo y L-ornitina) o poloxámeros y sustancias relacionadas (b: synperonic L122, pluronic F68 y F127, synperonic P85, F108 y NP30, arkopal) y normalizado al control sin tratar (línea negra = 100 %, 3 experimentos diferentes \pm error estándar (sem)).

10 Figura 2:
Toxicidad e infectividad celular asistida por sustancias. Las células HEK293T se incubaron con concentraciones crecientes de sustancias de transducción seleccionadas de la clase de policationes (PEA) o poloxámeros (pluronic F68, F127 y synperonic F108); se usa microscopía de fase (barra de escala = 50 μ m) para comprobar la viabilidad celular; fila derecha: emisión de luz verde fluorescente de células HEK293T transducidas por LV (GP) a MOI 2,5 en presencia de sustancias (polibreno a 10 μ g/ml, otros a 1000 μ g/ml).

15 Figura 3:
Infectividad lentiviral asistida por sustancias en células HEK293T. (a) Transferencias por puntos representativas de análisis citofluorométrico incubadas con MOI decreciente de lentivirus que codifican GFP (GP) con y sin adyuvantes de transducción de la clase de policationes (PEA (a 1000 μ g/ml)) o poloxámeros (pluronic F68 (a 1000 μ g/ml), F127 (a 1000 μ g/ml) y synperonic F108 (a 1000 μ g/ml)) en concentraciones bien tolerables, se usó polibreno a 10 μ g/ml; (b) Cuantificación estadística de los experimentos de transducción descritos en a, en presencia de polibreno (10 μ g/ml), synperonic F108 (1000 μ g/ml) y ambas sustancias (3 experimentos diferentes \pm error estándar (sem)); (c) el synperonic F108 demostró una mejor infección que la infección del LV asistida por polibreno. El synperonic F108 solo o en combinación con polibreno (10 mg/ml) aumentó la cantidad media de células infectadas (dos experimentos independientes) en comparación con la transducción inducida por polibreno.

20 Figura 4:
Transferencia de genes lentivirales asistida por adyuvantes en células de linfoma anaplásico de células grandes (ALCL). (a) Se infectaron cuatro líneas celulares ALCL con igual MOI y polibreno 10 μ g/ml; (b) Cuantificación estadística de la eficiencia de transducción en células KARPAS-299 y SR-786 en presencia de polibreno (10 μ g/ml), synperonic F108 (1000 μ g/ml) o ambas sustancias (3 experimentos diferentes \pm error estándar (sem)); (c) Análisis de la tasa de apoptosis y permeabilidad celular del PI en células SR-786; (d) Cuantificación estadística de la permeabilidad del PI y la inducción de apoptosis en células KARPAS-299 y SR-786 (2 experimentos diferentes \pm error estándar (sem)); (e) Synperonic F108 hasta una concentración máxima aplicada (5000 μ g/ml) para facilitar la infección lentiviral de las células de linfoma KARPAS-299 y SR-786. El synperonic F108 demostró una mejor infección cuando se usa solo o en combinación con polibreno, en comparación con la infección del LV asistida por polibreno solo; (f) Se probó el efecto de la etapa de espinoculación durante la infección del LV en combinación con el uso de adyuvantes para facilitar la infección lentiviral de las células de linfoma KARPAS-299 y SR-786. El protocolo de espinoculación resultó en una mejor infección de las células en comparación con las células infectadas sin el paso de espinoculación.

25 Figura 5:
El synperonic F108 mejora la transducción de células linfoides primarias de origen de células T. Transferencias por puntos representativas del análisis citofluorométrico de linfocitos primarios de dos donantes (a: donante núm. 1, b: donante núm. 2) incubados con MOI decreciente de lentivirus que codifican GFP (GP) con adyuvantes polibreno (a 10 μ g/ml), synperonic F108 (a 1000 μ g/ml) y una combinación de ambos en las concentraciones indicadas; en los gráficos, la cuantificación estadística de los experimentos de transducción se representa como el valor medio de 2 experimentos diferentes \pm error estándar (sem).

30 Figura 6:
Toxicidad e infectividad celular asistida por adyuvantes en células de carcinoma pancreático. Microscopía de fase y fluorescencia combinada (barra de escala = 50 μ m) de células AsPC-1 y PANC-1 de carcinoma pancreático transducidas por LV (SIH1) a MOI 2,5 incubadas sin sustancia, polibreno (10 μ g/ml), synperonic F108 (1000 μ g/ml) o ambas sustancias; en los casos indicados, las células se centrifugaron adicionalmente durante 60 minutos a 1000 g.

35 Figura 7:
Transferencia de genes lentivirales asistida por adyuvantes en otras células ALCL. (a) Cuantificación estadística de la eficiencia de la transducción del LV en células SUDHL-1 y SUP-M2 en presencia de polibreno (10 μ g/ml), synperonic F108 (1000 μ g/ml) o una combinación de ambas sustancias (3 experimentos diferentes \pm error estándar (sem)); (b) Cuantificación estadística de la permeabilidad del PI y la inducción de apoptosis en células SUDHL-1 y SUP-M2 (2 experimentos diferentes \pm error estándar (sem)).

40 Los ejemplos ilustran la invención:

Ejemplo 1: métodos

Líneas celulares y productos químicos

5 Las células renales embrionarias humanas HEK293T se cultivaron en DMEM complementado con suero de ternero fetal (FCS) al 10 % (vol/vol) y glutamina 2 mM. Las líneas celulares de linfoma anaplásico de células grandes KARPAS-299, SUDHL-1, SR-786 y SUP-M2 se cultivaron en RPMI 1640 suplementado con FCS al 10 % y glutamina 2 mM, línea celular de carcinoma pancreático AsPC-1 en RPMI 1640 con FCS al 20 %, Glutamina 2 mM y piruvato de sodio 1 mM y PANC-1 en DMEM complementado con FCS al 10% y glutamina 4 mM. Todos los candidatos a
10 adyuvantes químicos se adquirieron de Sigma-Aldrich y se disolvieron en agua para obtener soluciones madre de 100 mg/ml.

Ensayo de proliferación celular (ensayo WST-1)

15 En placas de 6 pocillos, por triplicado de 2×10^5 células por pocillo se sembraron y se trataron con concentraciones de adyuvante definidas que van desde 1 mg/ml a 1000 μ g/ml. Después de 24 horas de incubación (a 37 °C con 5 % de CO₂), el medio se intercambió con medio fresco y las células se incubaron durante 48 horas adicionales. La proliferación celular se determinó con el ensayo de proliferación celular colorimétrico WST-1 (Roche), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En breve, las células se tripsinizaron seguido de 100 μ l de la incubación de
20 células con 10 μ l de sustrato WST-1 (a 37 °C con 5 % de CO₂) durante 2 horas. El ensayo se realizó en placas de microtitulación de 96 pocillos y se determinó la absorbancia a 490 nm mediante el uso de un lector de microplacas TECAN-Infinite (TECAN).

Producción de lentivirus

25 Los vectores de transducción lentivirales pGreenPuro (pGP) y pSIH1-H1-copGFP (pSIH1) (System Biosciences) permiten la expresión de copGFP impulsada por un promotor interno de CMV. Se produjeron partículas lentivirales defectuosas en la replicación (GP) mediante cotransfección transitoria de células HEK293T en una placa de Petri de 10 cm con 16 μ g, 8 μ g y 4 μ g de plásmidos de empaquetamiento pMDLg/pRRE, pRSV.Rev y pMD2.G (una especie regalo de D. Trono, Ecole polytechnique fédérale de Lausanne) y 8 μ g de vector pGP mediante el uso de
30 Lipofectamine 2000 (Life Technologies) como reactivo de transfección de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En segundo lugar, se produjeron partículas de virus lentivirales (SIH1) en células HEK293T usando una mezcla de empaquetamiento de plásmido pPackH1 de acuerdo con las instrucciones de la compañía (System Biosciences).

35 Las partículas de virus se recogieron 48 horas después de la transfección, se eliminaron los restos celulares mediante centrifugación a baja velocidad y se filtraron mediante filtros Stericup de 0,45 μ m. El lentivirus se concentró mediante ultrafiltración mediante el uso de columnas Amicon-20 (ambas de Millipore) de acuerdo con las directrices del fabricante. Las alícuotas concentradas de virus se almacenaron a -80 °C. Los títulos de virus se determinaron
40 mediante análisis citofluorimétrico de la expresión de copGFP en células HEK293T infectadas con virus diluido en serie.

Infección viral de líneas celulares.

45 Las células HEK293T (2×10^5 células por pocillo) se cubrieron con 1 ml de lentivirus que contiene el medio (GP) con o sin adyuvantes. Las células de carcinoma pancreático AsPC-1 y PANC-1 (10^4 células por pocillo) se cubrieron con 250 μ l de sobrenadante que contiene lentivirus (SIH1) con o sin adyuvantes. En un caso dado, las placas se centrifugaron a 1000 g durante 60 minutos. Después de 24 horas de incubación (a 37 °C con 5 % de CO₂), el sobrenadante se intercambió con medio fresco y se incubó durante 48 horas adicionales. El análisis microscópico y la documentación combinados se realizaron 48 horas después de la infección (HBO 50/AC y AxioCam MRC, Carl Zeiss AG). Las células en suspensión Karpas 299, SUDHL-1, SR-786 y SUP-M2 (10^6 células por pocillo) se
50 resuspendieron en 1 ml lentivirus que contiene el medio (GP) con o sin adyuvantes. Las placas se centrifugaron a 800 g durante 90 minutos. Las células SUDHL-1 se lavaron y se resuspendieron en medio fresco directamente después de la centrifugación y se incubaron durante 48 horas. Las células KARPAS-299, SR-786 y SUP-M2 se
55 incubaron en 1 ml de medio que contenía lentivirus durante la noche después de la centrifugación, luego se lavaron y se resuspendieron en medio de cultivo fresco durante 48 horas adicionales de incubación.

Infección viral de células linfoides primarias de origen T

60 Las PBMC de dos donantes sanos se recopilaron de acuerdo con las aprobaciones y los requisitos de la junta ética local y los principios expresados en la Declaración de Helsinki. Las PBMC se aislaron mediante centrifugación en gradiente de ficoll, se cultivaron durante tres días en medio RPMI suplementado con suero humano, 50 U/ml de IL-2 (vacunas Chiron) y 50 ng/ml de OKT3 (estándares LGC). Después de la activación, se resuspendieron 5×10^5 células por pocillo en 500 μ l de medio complementado que contenía lentivirus (GP) con o sin adyuvantes. Las placas se centrifugaron a 800 g durante 90 minutos, se incubaron durante la noche, luego se lavaron y se resuspendieron
65 en medio suplementado fresco durante 24 horas adicionales de incubación.

Análisis citofluorimétrico

Después de la transducción lentiviral, las células se lavaron en PBS y se resuspendieron en PBS con 1 µg/ml de yoduro de propidio (Invitrogen). Después de 10 minutos de incubación en hielo, se analizaron 30 000 eventos para determinar las características de dispersión hacia adelante/hacia los lados, la emisión de luz de fluorescencia verde a 530 nm y la emisión de luz de fluorescencia roja a 610 nm en FACSDiva (BD Biosciences). Para las mediciones de apoptosis, las células se lavaron en PBS y se resuspendieron en etanol al 70 % (vol/vol) seguido de una incubación de 45 minutos en hielo. Después de la fijación, las células se centrifugaron y los sedimentos se resuspendieron en PBS con 40 µg/ml de yoduro de propidio y 100 µg/ml de ARNasa (Qiagen). Las células se analizaron en FACSDiva solo para la emisión de luz de fluorescencia roja, se analizaron 30 000 eventos para determinar la proporción Sub-G1 de células apoptóticas (<2n).

Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron al menos en dobletes. En los gráficos correspondientes se representan los valores medios ± error estándar (sem) si no se indica de cualquier otra manera.

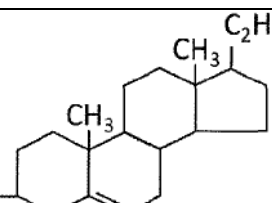
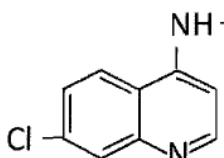
Ejemplo 2: Perfiles de toxicidad celular de adyuvantes de policación y poloxámero

De las sustancias adyuvantes potenciales para la administración de genes lentivirales, seleccionamos cinco representantes de la clase de sustancias químicas similares a policación y siete de la clase de sustancias químicas similares a poloxámero (Tabla 1). Las células HEK293T se coincubaron con una concentración de sustancia definida durante 24 horas, luego se cambió el medio y las células se incubaron durante 48 horas adicionales antes de las mediciones de la proliferación celular. Para probar la inhibición del crecimiento de HEK293T específico por diferentes sustancias, medimos la incorporación del sustrato WST1 y la correlacionamos con la población de células de control sin ninguna coincubación de sustancias (Figura 1). Esta configuración se organizó de acuerdo con los protocolos de transducción comunes que incluyen 24 horas de incubación de LV con células diana antes de que se eliminen el LV y el adyuvante (polibreno).

Para la clase de politaciones, todas las sustancias demostraron un comportamiento no tóxico a 10 µg/ml (Figura 1a). Con concentraciones crecientes, dos sustancias (polibreno y colesterilcarbamato) indujeron una reducción masiva de la proliferación celular. Finalmente, solo el policación PEA permaneció no tóxico a 1000 µg/ml. Por lo tanto, solo 1 de 5 politaciones de tipo polibreno tenía un perfil de toxicidad ventajoso a concentraciones muy altas. Como segunda clase de sustancias, los poloxámeros se toleraron bien a 10 µg/ml (Figura 1b). Con una cantidad creciente, se pudieron administrar tres sustancias (pluronic F68, F127 y synperonic F108) incluso a 1000 µg/ml sin reducir la viabilidad celular de las células HEK293T. Por el contrario, el synperonic NP30 relacionado con poloxámero y Arkopal mostró inhibición de la proliferación celular ya a bajas concentraciones y no se consideraron para experimentos adicionales. En total, solo 4 de los 12 candidatos a adyuvantes proporcionaron un perfil de toxicidad mejorado en comparación con el polibreno. Por lo tanto, hemos usado PEA así como pluronic F68, F127 y synperonic F108 para la posterior transducción del LV de células HEK293T (Figura 2). Solo el synperonic F108 mostró una eficiencia de transducción comparable a la del polibreno, mientras que la PEA mostró bajas tasas de transducción. Curiosamente, los pluronic F68 y F127 no muestran ninguna mejora en la transducción viral (como lo hacen el polibreno y el synperonic F108). Sin embargo, no inhiben la infección por virus en sí.

45

Tabla 1 Adyuvantes candidatos para la transducción lentiviral de clase I, policationes (tipo polibreno) y clase II, poloxámeros y sustancias relacionadas, descritos con nombres, términos químicos, peso molecular (MW) y configuraciones.

Clase	Policationes como polibreno	
Nombre	Polibreno	
Término químico	MW	1,5-dimetil-1,5-diaza-undeca-metilen-polimetobromuro 4-6
(kDa)		
Configuración	$\text{H} \left[\begin{array}{c} \text{C}_2\text{H}_6 \\ \\ \text{N} - \text{C}_6\text{H}_{12} - \text{N} - \text{C}_3\text{H}_6 \\ \\ \text{C}_2\text{H}_6 \end{array} \right]_n \text{OH} \cdot \text{HBr}$	
Clase	Policationes como polibreno	
Nombre	Colesterilcarbamato	
Término químico	MW	Clorhidrato de colesteril-3β-N-(dimetil-amino-etil)-carbamato 0,7
(kDa)		
Configuración	$\text{C}_2\text{H}_6 - \text{N} - \text{C}_2\text{H}_4 - \text{NH} - \text{CO}_2 - \text{[Esteril]} \cdot \text{HCl}$ 	
Clase	Policationes como polibreno	
Nombre	Dextrano	
Término químico	MW	Clorhidrato de dietil-aminoetil-dextrano > 500
(kDa)		
Configuración	$\left[\text{C}_2\text{H}_5 \right]_2 \text{N} - \text{C}_2\text{H}_4 - \text{O} - \text{C}_2\text{H}_4 - \text{N} \left[\text{C}_2\text{H}_5 \right]_2 \cdot \text{HBr}$	
Clase	Policationes como polibreno	
Nombre	PEA	
Término químico	L-α-fosfatidil-etanolamina-dioleilo	
MW (kDa)	0,7	
Configuración	$\left[\text{C}_7\text{H}_{15} - \text{C} = \text{C} - \text{C}_7\text{H}_{14} - \text{CO}_2 \right]_2 \text{C}_2\text{H}_3 - \text{O} - \text{PO}_4\text{H} - \text{C}_2\text{H}_4 - \text{NH}_2$	
Clase	Policationes como polibreno	
Nombre	Cloroquina	
Término químico	Difosfato de N'-(7-cloroquinolin-4-il)-N,N-dietil-pentano-1,4-diamina	
MW (kDa)	0,5	
Configuración	$\text{Cl} - \text{[Quinolin]} - \text{NH} - \text{C}_2\text{H}_4 - \text{C}_3\text{H}_6 - \text{N} \left[\text{C}_2\text{H}_5 \right]_2 \cdot \text{H}_3\text{PO}_4$ 	

(continuación)

5	Clase Nombre Término químico MW (kDa) Configuración	Policonaciones como polibreno L-ornitina Acetato-hidrobromuro de poli-L-2,5-diamino-pentanoico 5-15
10		$\text{H} \left[\text{NH} - \overset{\text{NH}_2}{\underset{ }{\text{C}_4\text{H}_7}} - \text{CO} \right]_n \text{H} \cdot \text{HBr}$
15	Clase Nombre	Poloxámeros y sustancias afines Synperonic L122 Synperonic P85 Pluronic F68 Pluronic F127
20	Término químico MW (kDa)	Synperonic F108 Óxido de polietileno-óxido de propileno 4,4 4,6 8,4 12,6 14,6
25	Configuración	$\text{H} \left[\text{O} - \text{C}_2\text{H}_4 \right]_x \left[\text{O} - \text{C}_2\text{H}_4 - \text{CH}_2 \right]_y \left[\text{O} - \text{C}_2\text{H}_4 \right]_z \text{OH}$ <p>Las sustancias difieren en la longitud de la cadena (x, y z)</p>
30		
35	Clase Nombre Término químico MW (kDa) Configuración	Poloxámeros y sustancias afines Synperonic NP30 Arkopal (NP100) 4-Nonil-fenil-polietilenglicol 0,7 0,8
40		$\text{C}_9\text{H}_{19} - \text{C}_6\text{H}_4 - \left[\text{O} - \text{C}_2\text{H}_4 \right]_n \text{OH}$ <p>Las sustancias difieren en la longitud de la cadena (n)</p>
45		

Ejemplo 3: Transferencia de genes lentivirales asistida por adyuvantes a células HEK293T

Se cubrieron células HEK293T (durante 24 horas) con una mezcla de LV con adyuvante especificado en una concentración máxima tolerable (1000 µg/ml). Se aplicó LV que portaba un transgén que codifica CopGFP para disminuir la MOI de 2,5 a 0,0025. Después del cambio de medio, las células se cultivaron durante otras 48 horas y se midió la emisión de luz fluorescente verde mediante citometría de flujo. En la Figura 3a se muestran cuatro experimentos representativos en transferencias de puntos. La transducción sin adyuvantes mostró tasas de transducción bajas en todo el intervalo de MOI. El polibreno tenía la capacidad de aumentar las tasas de transducción del 31,5 % al 48,4 % (MOI 0,25) a la concentración recomendada de 10 µg ml.

Otras sustancias no lograron aumentar aún más este nivel de transducción (la PEA se muestra como ejemplo en la Figura 3a), espere un candidato adyuvante: Synperonic F108. A una concentración bien tolerada de 1000 mg/ml, este poloxámero demostró mejores tasas de transducción que la infección del VI asistida por polibreno. El synperonic F108 aumentó la cantidad media de células transducidas al 61,4 % (MOI 0,25) e incluso funcionó a MOI 0,025 y aumentó la transducción del 15,5 al 19,6 % en comparación con la transducción inducida por polibreno. Además, preguntamos si el polibreno y el synperonic F108 podrían combinar sus capacidades de transducción individuales y coadministrarse tanto a premezclas de LV solas como en combinación para infecciones de células HEK293T posteriores (Figura 3b). Con esta combinación, podríamos aumentar las tasas de transducción total inducida por synperonic F108 hasta un 5 % adicional. Como prueba adicional, las líneas celulares de carcinoma pancreático adherentes AsPC-1 y PANC-1 indicaron mayores cantidades de células positivas para GFP cuando se

trataron conjuntamente con polibreno y synperonic F108 durante la infección. Además, un paso de espinoculación aumentó los niveles de transducción basal y condujo a velocidades máximas de transducción en combinaciones de polibreno y synperonic F108 (Figura 6).

5 Ejemplo 4: Transferencia de genes lentivirales asistida por adyuvantes en células de linfoma

Muchas líneas de células tumorales establecidas en la investigación preclínica ofrecen solo tasas de transfección bajas con herramientas virales y no virales comunes. Las líneas celulares de linfoma anaplásico de células grandes (ALCL) que crecen en cultivos en suspensión pertenecen a este subconjunto difícil de infectar de líneas celulares tumorales⁸. Con un protocolo modificado que incluía una etapa de espinoculación durante la infección del LV, probamos el synperonic F108 para facilitar la infección lentiviral de las células de linfoma KARPAS-299, SR-786, SUDHL-1 y SUP-M2 (Figura 4b). En particular, con las mismas tasas medias de MOI (1,5), las células Karpas-299 estaban infectadas en un 20,8 % en presencia de polibreno y SR-786 ya mostraba una tasa de infección del 58,8 % (Figura 4a). Las células KARPAS-299 mostraron un aumento en las células positivas para GFP desde el 58,4 % en presencia de polibreno al 85,2 % en presencia de synperonic F108 en la premezcla con LV (Figura 4b). En intervalos de MOI más bajos, las tasas de transducción asistida por polibreno aumentan del 21,9 % al 33,7 % o, respectivamente, al 41,0 % en el tratamiento combinado (adición de polibreno y synperonic F108). La tasa de transducción de las células SR-786 aumentó de forma similar a las células KARPAS-299 en MOI 1,5 desde 64,9 % (polibreno) hasta 84,1 % (synperonic F108). Otras líneas celulares de linfoma (SUDHL-1 y SUP-M2) mostraron efectos similares en la mejora de la administración del LV por el synperonic F108 (Figura 7a).

Ejemplo 5: Impacto del synperonic F108 en la permeabilización de las membranas de las células diana

En los experimentos previos, el poloxámero synperonic F108 no iónico demostró una mejor eficiencia para ayudar a la transducción lentiviral que el polibreno conocido como adyuvante líder en el campo. Se describe que los poloxámeros interactúan directamente con las membranas celulares, por lo que preguntamos si el estado de permeabilización de las células diana cambia por el synperonic F108. Como método para monitorizar la capacidad de permeabilización de las membranas de las células de linfoma, administramos yoduro de propidio (PI) para su incorporación en las células tras la incubación con polibreno, synperonic F108 o ambas sustancias. En general, el PI solo se acumula en células altamente permeables o con fugas (Figura 4c). Todas las líneas celulares de linfoma demostraron una permeabilidad notablemente mayor para el PI en presencia de synperonic F108 en comparación con el tratamiento con polibreno con la excepción de las células SUDHL-1 (Figura 4d y Figura 7b). Para controlar el fondo de las células apoptóticas (<2n) medimos en ADN fragmentado en paralelo (Figura 4c, d). Estos hallazgos indican un efecto de membrana no tóxico favorable para el synperonic F108 que permite la transducción exitosa de partículas lentivirales a través de las membranas celulares.

Ejemplo 6: Synperonic F-108 mejora la transducción en linfocitos primarios

En experimentos de líneas celulares, el synperonic F108 demostró una alta efectividad en infecciones lentivirales, especialmente en combinación con el polibreno. Como las células primarias difieren sustancialmente en su susceptibilidad a la transferencia de genes virales, evaluamos la vitalidad y las tasas de transducción lentiviral de los linfocitos primarios aislados de la sangre de dos donantes sanos. Ambas muestras mostraron tasas de transducción dependientes del donante más bajas incluso con niveles altos de MOI (de 2,5 a 25) en comparación con las líneas celulares tratadas con el mismo protocolo de espinoculación (Fig. 5). El synperonic F108 solo y en combinación con polibreno logró aumentar la transducción de linfocitos primarios por el factor 2 (del 22,2 % al 41,7 % para el donante núm. 1, Figura 5a) o incluso por el factor 4 (del 5,2 % al 19,2 % para el donante núm. 2, Figura 5b). Ni el F108 solo ni el tratamiento combinado indujeron una muerte celular notable en esas células diana. Los resultados obtenidos en líneas celulares de linfoma y linfocitos primarios subrayan el papel prometedor del synperonic F108 como adyuvante de transducción de partículas lentivirales.

Ejemplo 7: Transferencia de genes lentivirales asistida por adyuvante en células HEK293T

Las células HEK293T se cubrieron (durante 24 horas) con una mezcla de LV como se usó en el ejemplo 3 con adyuvante especificado hasta una concentración máxima aplicada de 5000 µg/ml de Synperonic F108. Las partículas de lentivirus (GP) como se usa en el Ejemplo 3, llevan un transgén que codifica CopGFP a MOI 0,25 y 0,025. Después del cambio de medio, las células se cultivaron durante otras 48 horas y se midió la emisión de luz fluorescente verde mediante citometría de flujo. El synperonic F108 fue bien tolerado en todas las concentraciones probadas sin toxicidad apreciable (1000 µg/ml, 2500 µg/ml y 5000 µg/ml). El synperonic F108 demostró una mejor infección que la infección del LV asistida por polibreno (Figura 3c). El synperonic F108 solo o en combinación con polibreno (10 µg/ml) aumentó la cantidad media de células infectadas (dos experimentos independientes) en comparación con la transducción inducida por polibreno. En particular, a una MOI de 0,25, la cantidad de células infectadas aumentó del 49,5 % (polibreno 10 µg/ml) solo al 66,2 % cuando se usó el synperonic F108 a una concentración de (1000 µg/ml), a 68,2 % a una concentración de 2500 µg/ml, y al 64,3 % a una concentración de 5000 µg/ml. Cuando se usó el synperonic F108 en combinación con polibreno (10 µg/ml), la infección media aumentó aún más al 69,7 % (1000 µg/ml del synperonic F108), 71,2 % (2500 µg/ml del synperonic F108) y 64,8 % (5000 µg/ml del synperonic F108). Sin adyuvante, se observó una transducción media del 23 % de las células

cuando se usó una MOI de 0,25. El análisis estadístico con la prueba t de Student emparejada de dos caras (Tabla 2, más abajo) de 3 réplicas biológicas independientes demostró que el polibreno (10 µg/ml) y el synperonic F108 (1000 µg/ml), ambos mediaron un valor altamente significativo ($p < 0,0$) aumento en la infección de células HEK293 (MOI 0,25), y el synperonic F108 (1000 µg/ml) aumentó significativamente ($p < 0,05$) la infección de células HEK293 en comparación con polibreno (10 µg/ml).

Tabla 2 Análisis estadístico del efecto de los adyuvantes sobre la infección de células HEK293

	Polibreno ningún adyuvante	Synperonic F108 contra adyuvante	Synperonic F108 contra polibreno
MOI 0,25 valor de p de la prueba t de Student	0,007	0,0007	0,0227

Ejemplo 8: Transferencia de genes lentivirales asistida por adyuvantes en células de linfoma

Con un protocolo modificado que incluye una etapa de espinoculación durante la infección del LV, se probó el synperonic F108 hasta una concentración máxima aplicada (5000 µg/ml) para facilitar la infección lentiviral de las células de linfoma KARPAS-299 y SR-786 (Figura 4e). Las partículas de lentivirus (GP), como se usa en el Ejemplo 3, llevan un transgén que codifica CopGFP a MOI 2,5 y 0,25. El synperonic F108 fue bien tolerado en todas las concentraciones probadas sin toxicidad apreciable (1000 µg/ml, 2500 µg/ml y 5000 µg/ml) y demostró una mejor infección cuando se usa solo o en combinación con polibreno, en comparación con la infección del LV asistida por polibreno solo. En particular, en el MOI 2,5, el 59,5 % de las células Karpas-299 se infectaron en presencia de polibreno (10 µg/ml) solo, mientras que el 83,3 % se infectaron en presencia del synperonic F108 a una concentración de 1000 µg/ml, 81,7 % a una concentración de 2500 µg/ml y 77,5 % a una concentración de 5000 µg/ml. Cuando se infectaron células KARPAS-299 con la misma MOI (2,5) mediante el uso de una combinación de polibreno (10 µg/ml) con synperonic F108, la cantidad de células infectadas aumentó aún más al 86 % (1000 µg/ml de synperonic F108, 10 µg/ml de polibreno), 87,2 % a una concentración de (2500 µg/ml de synperonic F108, 10 µg/ml de polibreno) y 78,9 % (5000 µg/ml de synperonic F108, 10 µg/ml de polibreno), (Figura 4e).

En el mismo MOI 2,5, el 62,2 % de las células SR-786 se infectaron en presencia de polibreno (10 µg/ml) solo, mientras que el 82,3 % se infectaron en presencia de synperonic F108 a una concentración de 1000 µg/ml, 83,6 % a una concentración de 2500 µg/ml y 79,9 % a una concentración de 5000 µg/ml, respectivamente. A la misma MOI 2,5, 88 % se infectaron cuando se usó una combinación de polibreno (10 µg/ml) con synperonic F108 (1000 µg/ml), 87,2 % a una concentración del synperonic F108 (2500 mg/ml) y 81 % a una concentración del synperonic F108 (5000 µg/ml), (Figura 4e). Sin adyuvante, una media de 32,2 % de SR-786 y 37,2 % de células KARPAS-299, respectivamente, se infectaron con MOI 2,5.

Ejemplo 9: Impacto de la espinoculación en la transferencia de genes lentivirales en células de linfoma

El efecto de la etapa de espinoculación durante la infección del LV se probó en combinación con el uso de adyuvantes para facilitar la infección lentiviral de las células de linfoma KARPAS-299 y SR-786 (Figura 4f). Las partículas de lentivirus (GP) como se usa en el Ejemplo 3 que llevan un transgén que codifica CopGFP en dos MOI diferentes (2,5 y 0,25) en presencia de adyuvantes con y sin aplicación de un protocolo de espinoculación (centrifugación a 800 g durante 90 minutos a temperatura ambiente). En todas las MOI probadas, el protocolo de espinoculación resultó en una mejor infección de las células. En particular, con el protocolo de espinoculación en el MOI 2,5, el 59,5 % de las células Karpas-299 se infectaron en presencia de polibreno (10 µg/ml) solo, mientras que el 83,2 % se infectó en presencia de synperonic F108 a una concentración de 1000 µg/ml, y 86 % cuando se usaron tanto polibreno como synperonic F108. En el MOI 2,5, el 62,2 % de las células SR-786 se transdujeron en presencia de polibreno (10 µg/ml) solo, 82,3 % con synperonic F108 (1000 µg/ml) y 88 % cuando se usaron ambos adyuvantes.

Al infectar células Karpas-299 con una MOI de 2,5 sin espinoculación, el 17,8 % de las células se infectaron en presencia de polibreno (10 µg/ml), mientras que el 50 % se infectaron en presencia de synperonic F108 a una concentración de 1000 µg/ml, y la infección aumentó aún más cuando se usaron polibreno y synperonic F108 (Fig. 4f). Al infectar células Karpas-299 con una MOI de 0,25 sin espinoculación, el 5,7 % de las células se infectaron en presencia de polibreno (10 µg/ml), mientras que el 10,5 % se infectaron en presencia de synperonic F108 en una concentración de 1000 µg/ml, y la infección aumentó aún más hasta el 13,4 % cuando se usaron polibreno y synperonic F108 (Fig. 4f). Cuando las células SR-786 se infectaron con una MOI 2,5 sin espinoculación, el 36,3 % de las células SR-786 se transdujeron en presencia de polibreno (10 µg/ml) solo, el 58,2 % con synperonic F108 (1000 µg/ml), y 60,9 % cuando ambos adyuvantes se usaron juntos. Cuando las células SR-786 se infectaron a una MOI 0,25 sin espinoculación, el 8,8 % de las células SR-786 se transdujeron en presencia de polibreno (10 µg/ml) solo, el 14,1 % con synperonic F108 (1000 µg/ml), y 17,6 % cuando ambos adyuvantes se usaron juntos (Figura 4f).

Sin adyuvante, pero con espinoculación, el 32,6 % de las células SR-786 se infectaron con una MOI de 2,5, mientras que sin adyuvante y sin espinoculación solo el 13 % de las células se infectaron. Sin adyuvante, pero con espinoculación, el 37,2 % de las células Karpas-299 se infectaron usando una MOI de 2,5, mientras que solo el 3 %

de las células se infectaron sin adyuvante y sin espinoculación.

Referencias

- 5 (1) Burns, J.C. y otros. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 8033-8037 (1993).
- (2) Funke, S. y otros. Targeted cell entry of lentiviral vectors. *Mol. Ther.* 16, 1427-1436 (2008).
- 10 (3) Bukrinsky, M.I. y otros. A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells. *Nature* 365, 666-669 (1993).
- (4) Dull, T. y otros. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J. Virol.* 72, 8463-8471 (1998).
- (5) Gruber, A., Kan-Mitchell, J., Kuhen, K.L., Mukai, T. & Wong-Staal, F. Dendritic cells transduced by multiply deleted HIV-1 vectors exhibit normal phenotypes and functions and elicit an HIV-specific cytotoxic T-lymphocyte response in vitro. *Blood* 96, 1327-1333 (2000).
- 15 (6) Rouas, R. y otros. Lentiviral-mediated gene delivery in human monocyte-derived dendritic cells: optimized design and procedures for highly efficient transduction compatible with clinical constraints. *Cancer Gene Ther.* 9, 715-724 (2002).
- (7) Millington, M., Arndt, A., Boyd, M., Applegate, T. & Shen, S. Towards a clinically relevant lentiviral transduction protocol for primary human CD34 hematopoietic stem/progenitor cells. *PLoS One* 4, e6461 (2009).
- 20 (8) Anastasov, N. y otros. Efficient shRNA delivery into B and T lymphoma cells using lentiviral vector-mediated transfer. *J. Hematop.* 2, 9-19 (2009).
- (9) Anastasov, N. y otros. C/EBPbeta expression in ALK-positive anaplastic large cell lymphomas is required for cell proliferation and is induced by the STAT3 signaling pathway. *Haematologica* 95, 760-767 (2010).
- 25 (10) Wurm, M. y otros. The influence of semen-derived enhancer of virus infection on the efficiency of retroviral gene transfer. *J. Gene Med.* 12, 137-146 (2010).
- (11) Burns, J.C., Friedmann, T., Driever, W., Burrascano, M. & Yee, J.K. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 8033-8037 (1993).
- 30 (12) Hesse, J., Ebbesen, P. & Kristensen, G. Correlation between polyion effect on cell susceptibility to in vitro infection with murine C-type viruses and polyion effect on some membrane-related functions. *Intervirology* 9, 173-183 (1984).
- (13) Castro, B.A., Weiss, C.D., Wiviott, L.D. & Levy, J.A. Optimal conditions for recovery of the human immunodeficiency virus from peripheral blood mononuclear cells. *J. Clin. Microbiol.* 26, 2371-2376 (1988).
- 35 (14) Aubin, R.J., Weinfeld, M. & Paterson, M.C. Factors influencing efficiency and reproducibility of polybrene-assisted gene transfer. *Somat. Cell Mol. Genet.* 14, 155-167 (1988).
- (15) Lee, R.C., River, L.P., Pan, F.S., Ji, L. & Wollmann, R.L. Surfactant-induced sealing of electro-permeabilized skeletal muscle membranes in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 4524-4528 (1992).
- 40 (16) Lu, G.W., Jun, H.W., Dzimianski, M.T., Qiu, H.C. & McCall, J.W. Pharmacokinetic studies of methotrexate in plasma and synovial fluid following i.v. bolus and topical routes of administration in dogs. *Pharm. Res.* 12, 1474-1477 (1995).
- (17) Hannig, J. y otros. Surfactant sealing of membranes permeabilized by ionizing radiation. *Radiat. Res.* 154, 171-177 (2000).
- 45 (18) Gebhart, C.L. y otros. Design and formulation of polyplexes based on pluronic-polyethyleneimine conjugates for gene transfer. *Bioconjug. Chem.* 13, 937-944 (2002).
- (19) Kabanov, A., Zhu, J. & Alakhov, V. Pluronic Block Copolymers for Gene Delivery. *Adv. Genet.* 53, 231-261 (2005).
- (20) Dishart, K.L. y otros. Third-generation lentivirus vectors efficiently transduce and phenotypically modify vascular cells: implications for gene therapy. *J. Mol. Cell Cardiol.* 35, 739-748 (2003).
- 50 (21) Strappe, P.M., Hampton, D.W., Cachon-Gonzalez, B., Fawcett, J.W. & Lever, A. Delivery of a lentiviral vector in a Pluronic F127 gel to cells of the central nervous system. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 61, 126-133 (2005).
- (22) Jones, S. y otros. Lentiviral Vector Design for Optimal T Cell Receptor Gene Expression in the Transduction of Peripheral Blood Lymphocytes and Tumor-Infiltrating Lymphocytes. *Tararear. Gene Ther.* 20, 630-640 (2009).
- 55 (23) Hudecek, M., Anderson, L.D., Nishida, T. & Riddell, S.R. Adoptive T-cell therapy for B-cell malignancies. *Expert. Rev. Hematol.* 2, 517-532 (2009).
- (24) Rosenberg, S.A., Restifo, N.P., Yang, J.C., Morgan, R.A. & Dudley, M.E. Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* 8, 299-308 (2008).
- (25) Batrakova, E.V. y otros. Mechanism of pluronic effect on P-glycoprotein efflux system in blood-brain barrier: contributions of energy depletion and membrane fluidization. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 299, 483-493 (2001).
- 60 (26) Krylova, O.O. y otros. Pluronic L61 accelerates flip-flop and transbilayer doxorubicin permeation. *Chemistry* 9, 3930-3936 (2003).
- (27) Pec, E.A., Wout, Z.G. & Johnston, T.P. Biological activity of urease formulated in poloxamer 407 after intraperitoneal injection in the rat. *J. Pharm. Sci.* 81, 626-630 (1992).
- 65 (28) Carter, K.C., Gallagher, G., Baillie, A.J. & Alexander, J. The induction of protective immunity to *Leishmania major* in the BALB/c mouse by interleukin 4 treatment. *Eur. J. Immunol.* 19, 779-782 (1989).
- (29) Stefanescu, L. & Kovacs, K. Effects of drugs on pituitary fine structure in laboratory animals. *J. Electron.*

Microsc. Tech. 19, 80-89 (1991).

(30) Millington M., Arndt A., Boyd M., Applegate T., Shen S. 2009. Towards a Clinically Relevant Lentiviral Transduction Protocol for Primary Human CD34+ Hematopoietic Stem/Progenitor Cells. PLoS ONE 4 (7): e6461. doi:10.1371/journal.pone.0006461

5

REIVINDICACIONES

1. Un método in vitro o ex vivo para transducir una célula diana, el método comprende la etapa de poner en contacto una célula diana con un vector retroviral y un poloxámero que tiene un peso molecular de aproximadamente 14,6 kDa, en donde el poloxámero está en un estado fluido, y en donde dicho poloxámero tiene la fórmula $\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_x-(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_z-(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_y\text{H}$, en donde $x+y =$ aproximadamente 265 y $z =$ aproximadamente 50 en promedio, en donde "aproximadamente" se refiere a -10 % a +20 %.
2. El método de la reivindicación 1, en donde la célula diana es una célula seleccionada del grupo que consiste en un linfocito, una célula tumoral, una célula de linaje linfoide, una célula neuronal, una célula epitelial, una célula endotelial, una célula primaria, una célula madre.
3. El método de la reivindicación 2, en donde el linfocito es un linfocito primario y/o en donde la célula tumoral es una célula tumoral hematopoyética, una célula tumoral neuronal o una célula tumoral epitelial.
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el vector retroviral es un vector lentiviral.
5. El método de la reivindicación 4, en donde el vector lentiviral se pseudotipa con VSV-G y/o con un fragmento de anticuerpo fusionado con VSV-G.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicha célula diana se pone además en contacto con una o más sustancias policatiónicas seleccionadas del grupo de polímeros policatiónicos o péptidos policatiónicos.
7. El método de la reivindicación 6, en donde dichos polímeros policatiónicos se seleccionan del grupo que consiste en copolímero de bloques de poli(etilenglicol)-poli(L-lisina) (PEG-PLL) y 1,5-dimetil-1,5-diaza-undeca-metilpolimetobromuro (polibreno); y dichos péptidos policatiónicos se seleccionan del grupo que consiste en sulfato de protamina y poli-L-lisina (PLL) que tienen un peso molecular medio de 1 a 300 kDa.
8. El método de la reivindicación 6, en donde las sustancias policatiónicas son 1,5-dimetil-1,5-diaza-undeca-metil-polimetobromuro y/o sulfato de protamina.
9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde dicho poloxámero se proporciona a una concentración de aproximadamente 50 a 5000 $\mu\text{g/ml}$.
10. El método de la reivindicación 9, en donde dicho poloxámero se proporciona a una concentración de aproximadamente 500 a 1000 $\mu\text{g/ml}$.
11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende la etapa adicional de espinocular dicho vector retroviral con dicha célula diana antes, concomitantemente o después de poner en contacto dicha célula diana con dicho poloxámero.
12. Uso de un poloxámero que tiene un peso molecular de aproximadamente 14,6 kDa, en donde el poloxámero está en estado fluido y en donde dicho poloxámero tiene la fórmula $\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_x-(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_z-(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_y\text{H}$, en donde $x+y =$ aproximadamente 265 y $z =$ aproximadamente 50 en promedio, para transducir una célula diana in vitro o ex vivo con un vector retroviral, opcionalmente en combinación con una sustancia policatiónica como se define en cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en donde "aproximadamente" se refiere a -10 % a +20 %.
13. Un kit que comprende
 - (a) un poloxámero que tiene un peso molecular de aproximadamente 14,6 kDa, en donde el poloxámero está en un estado fluido y en donde dicho poloxámero tiene la fórmula $\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_x-(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_z-(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_y\text{H}$, en donde $x+y =$ aproximadamente 265 y $z =$ aproximadamente 50 en promedio, en donde "aproximadamente" se refiere a -10 % a +20 %; y
 - (b) un polímero policatiónico y un péptido policatiónico como se define en cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en donde el kit comprende además un vector retroviral y, opcionalmente, instrucciones de uso.

Figura 1

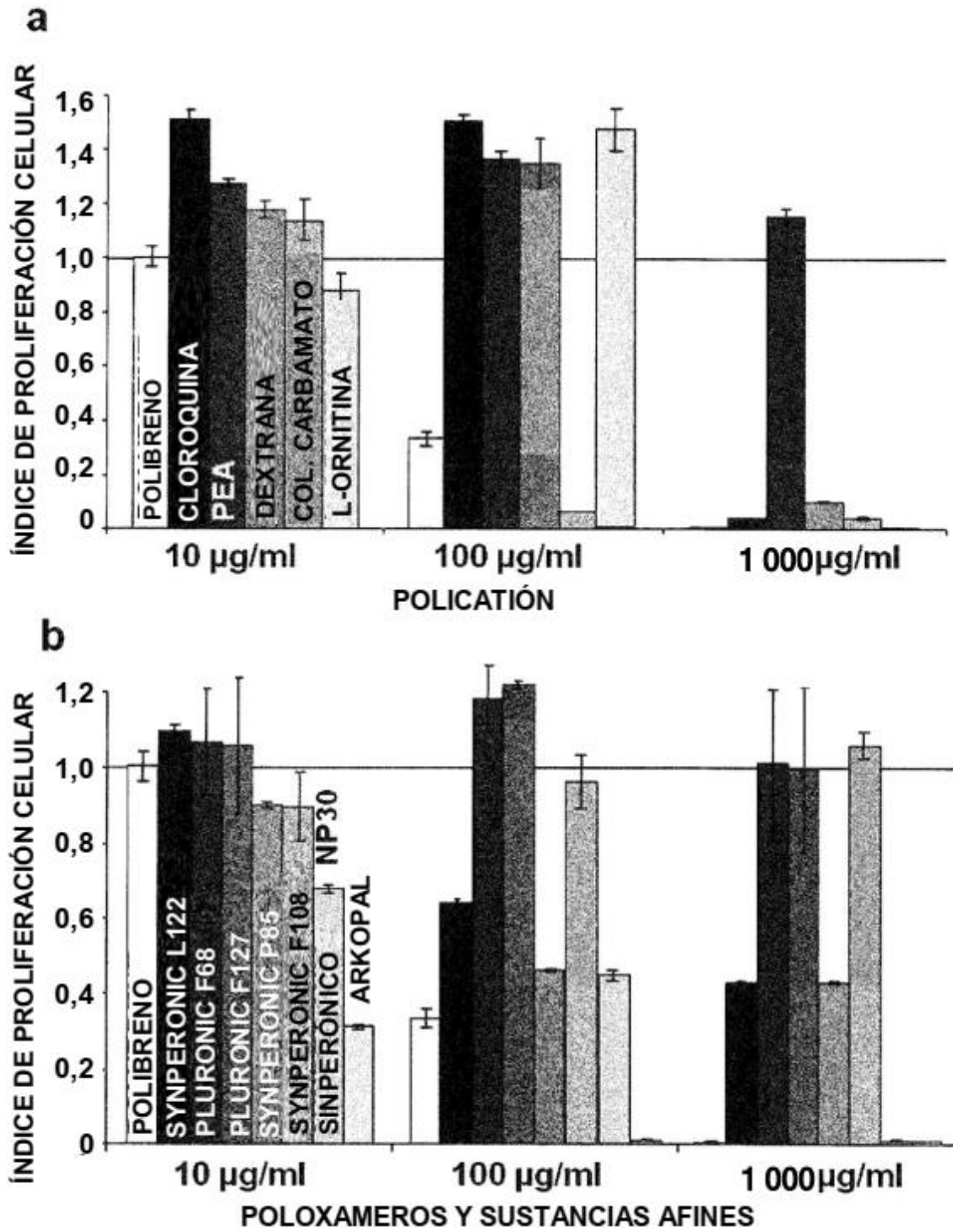


Figura 2

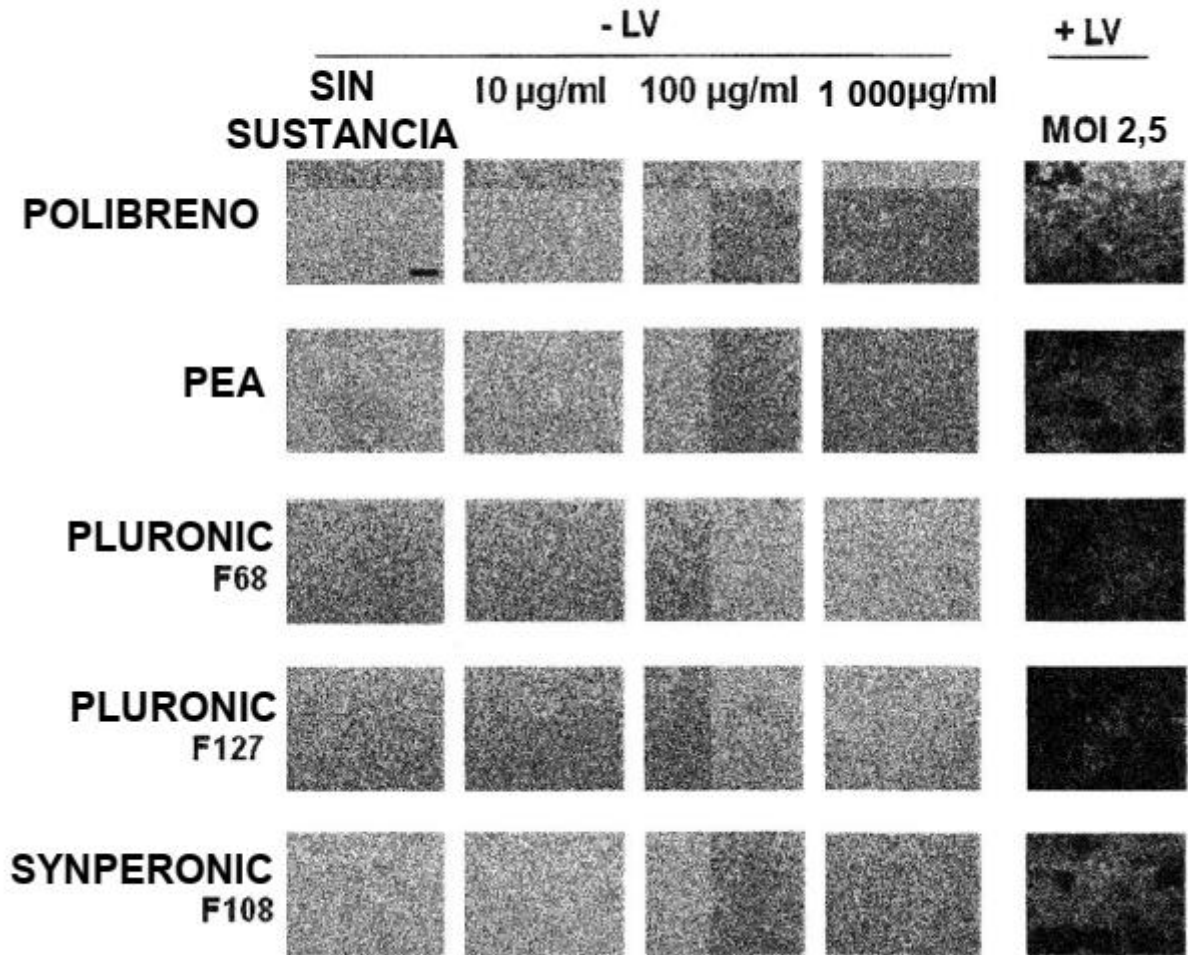


Figura 3

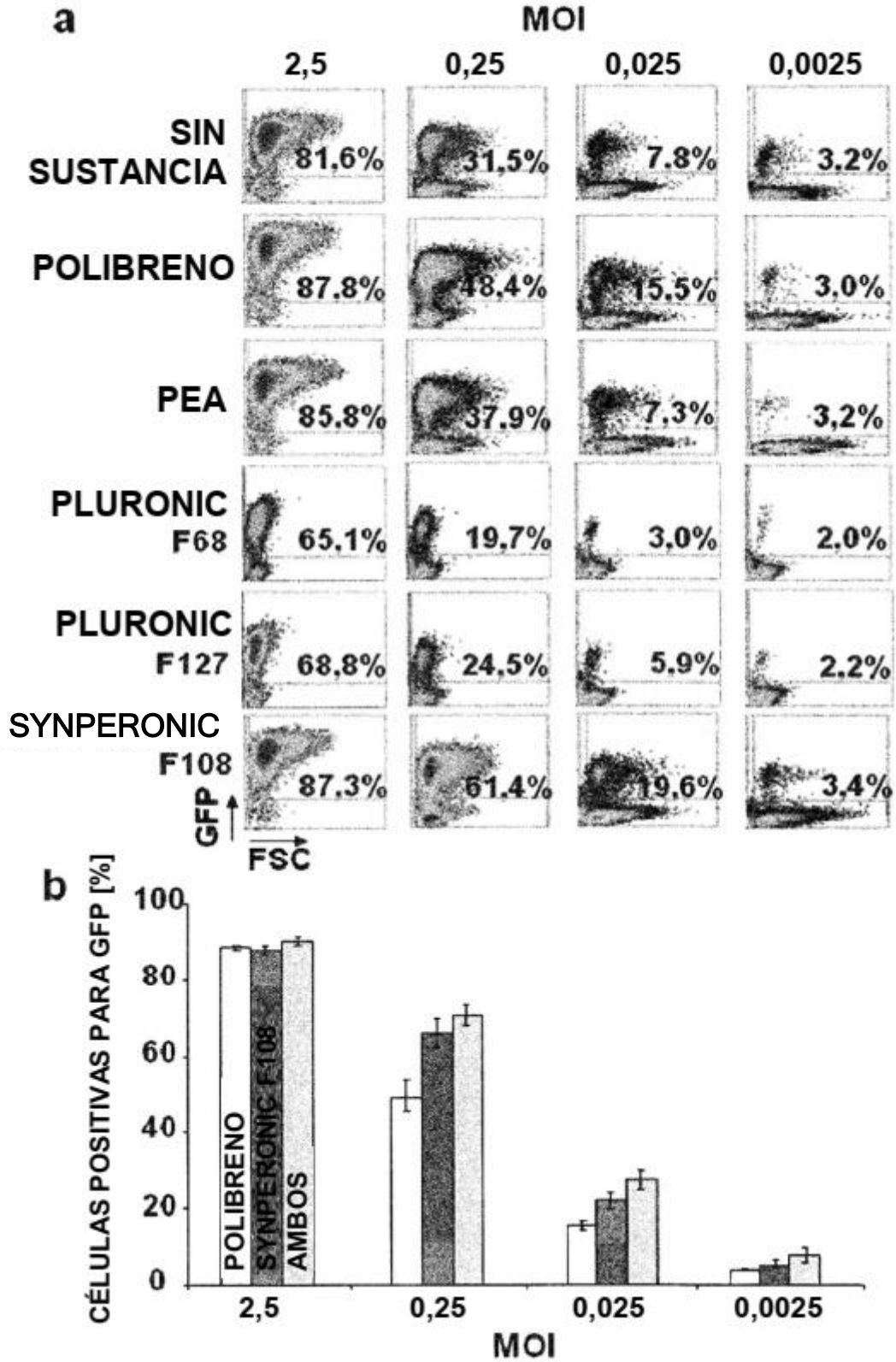


Figura 3 continuación

C

SYNPERONIC F108 (SYN F108), 1 000 µg/ml, 2 500 µg/ml Y 5 000 µg/ml

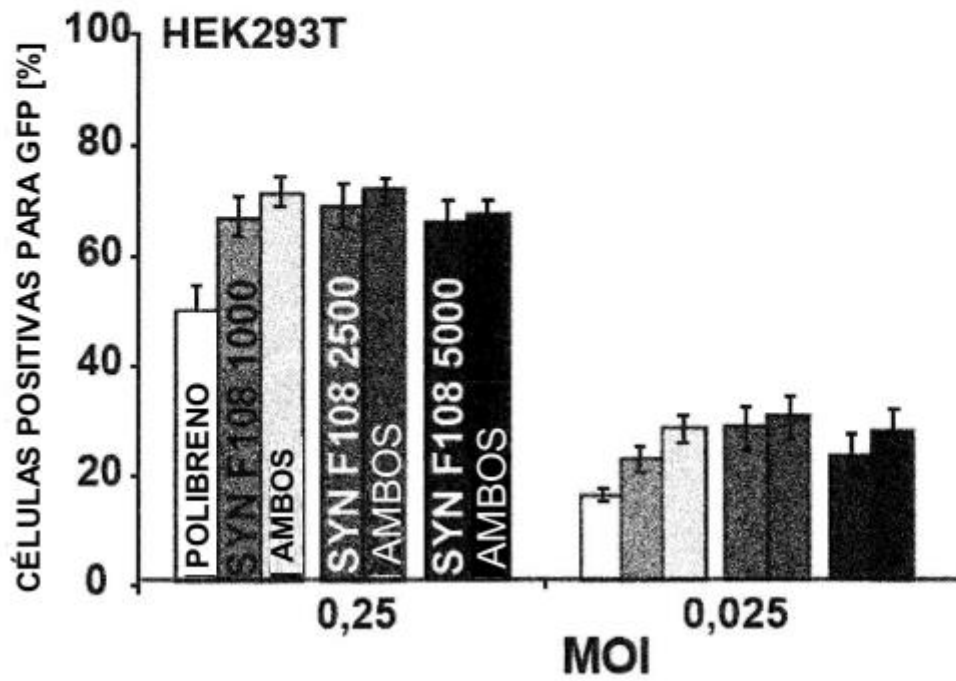


Figura 4

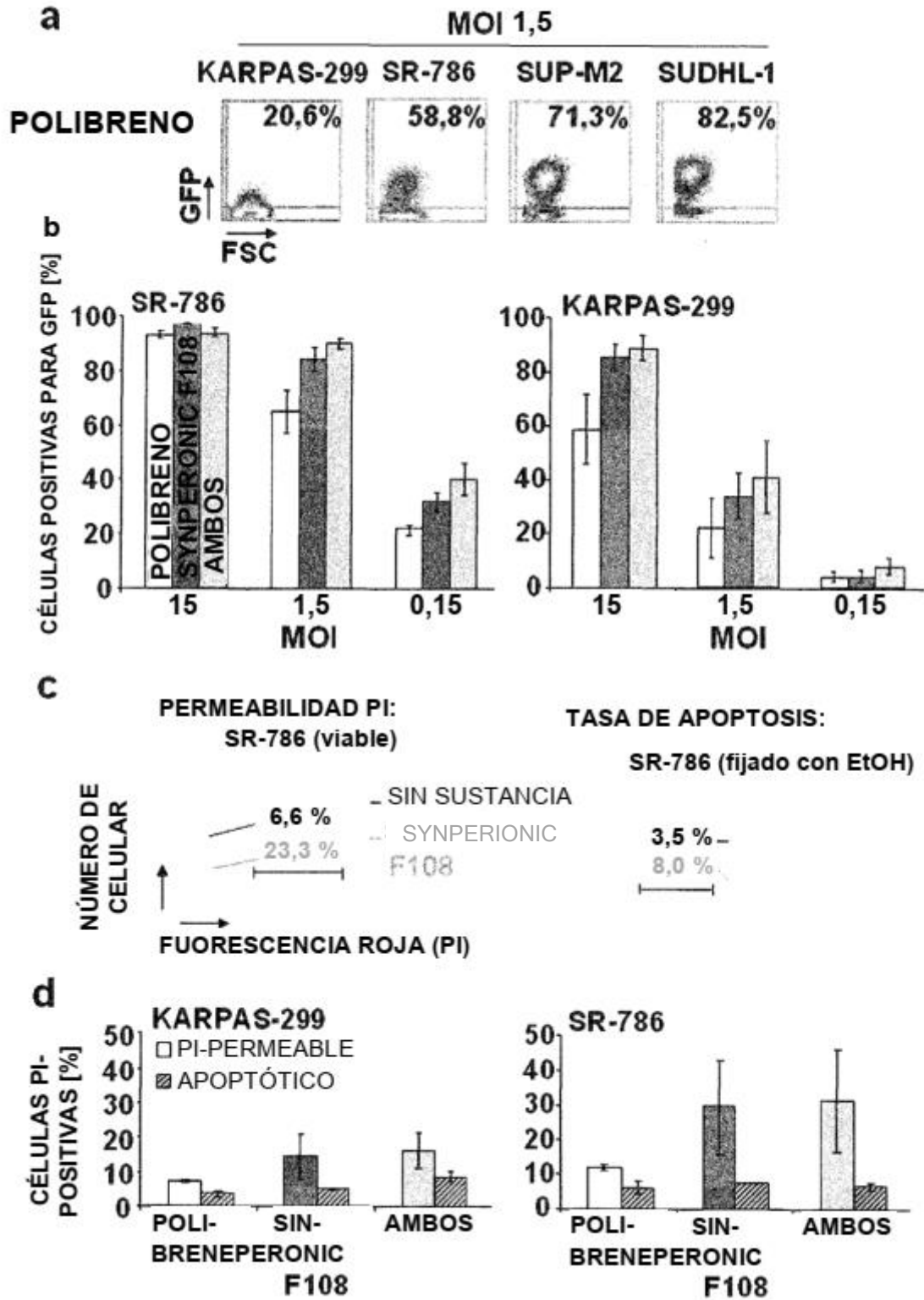


Figura 4 continuación

e

SYNPERONIC F108 (SYNF108), 1 000 µg/ml, 2 500 µg/ml y 5 000 µg/ml

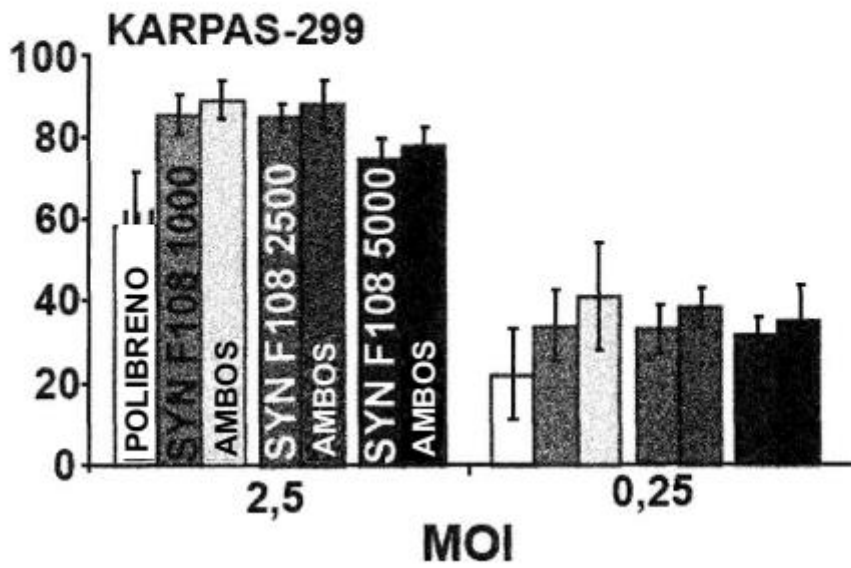
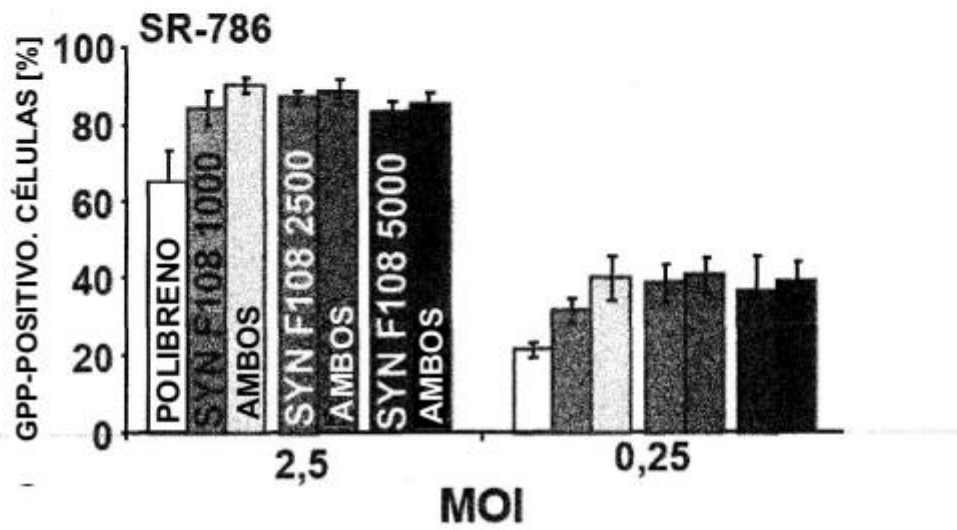
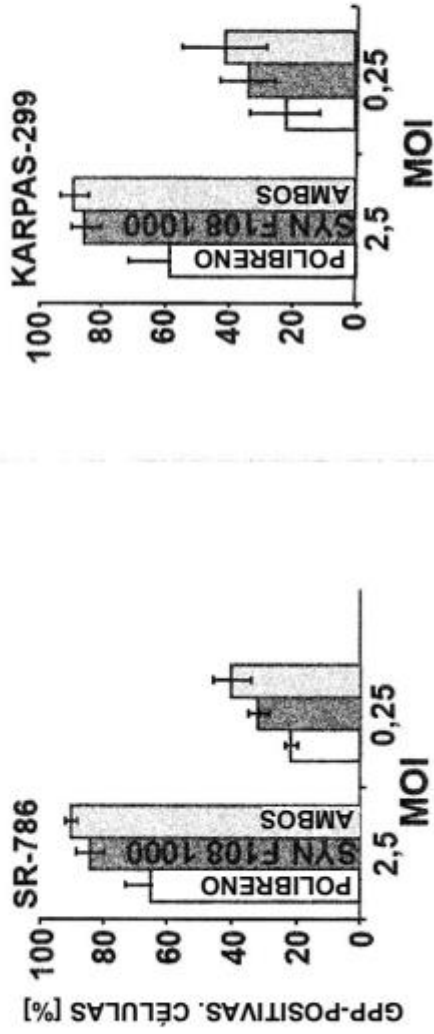


Figura 4 continuación

f

SYNPERONIC F108, 1 000 µg/ml PLUS CTG. (CENTRIFUGACIÓN, 800 G DURANTE 90 MINUTOS)



SYNPERONIC F108, 1 000 µg/ml MENOS CTG.

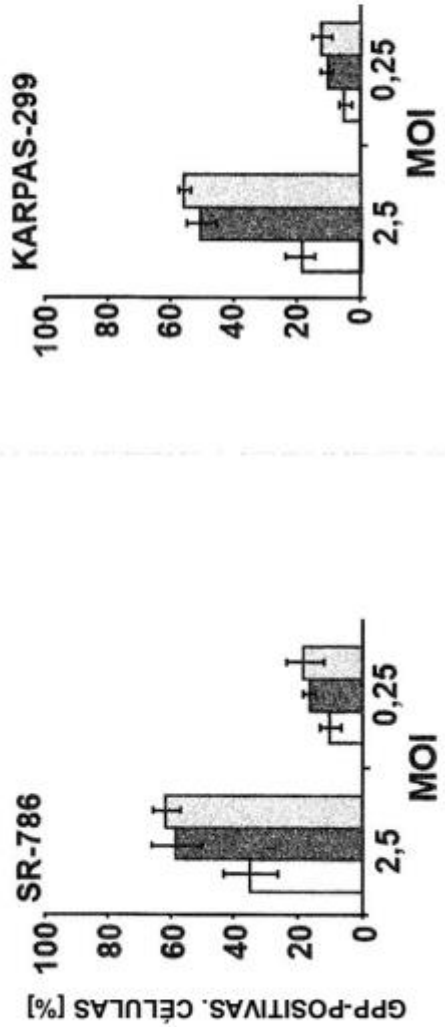


Figura 5

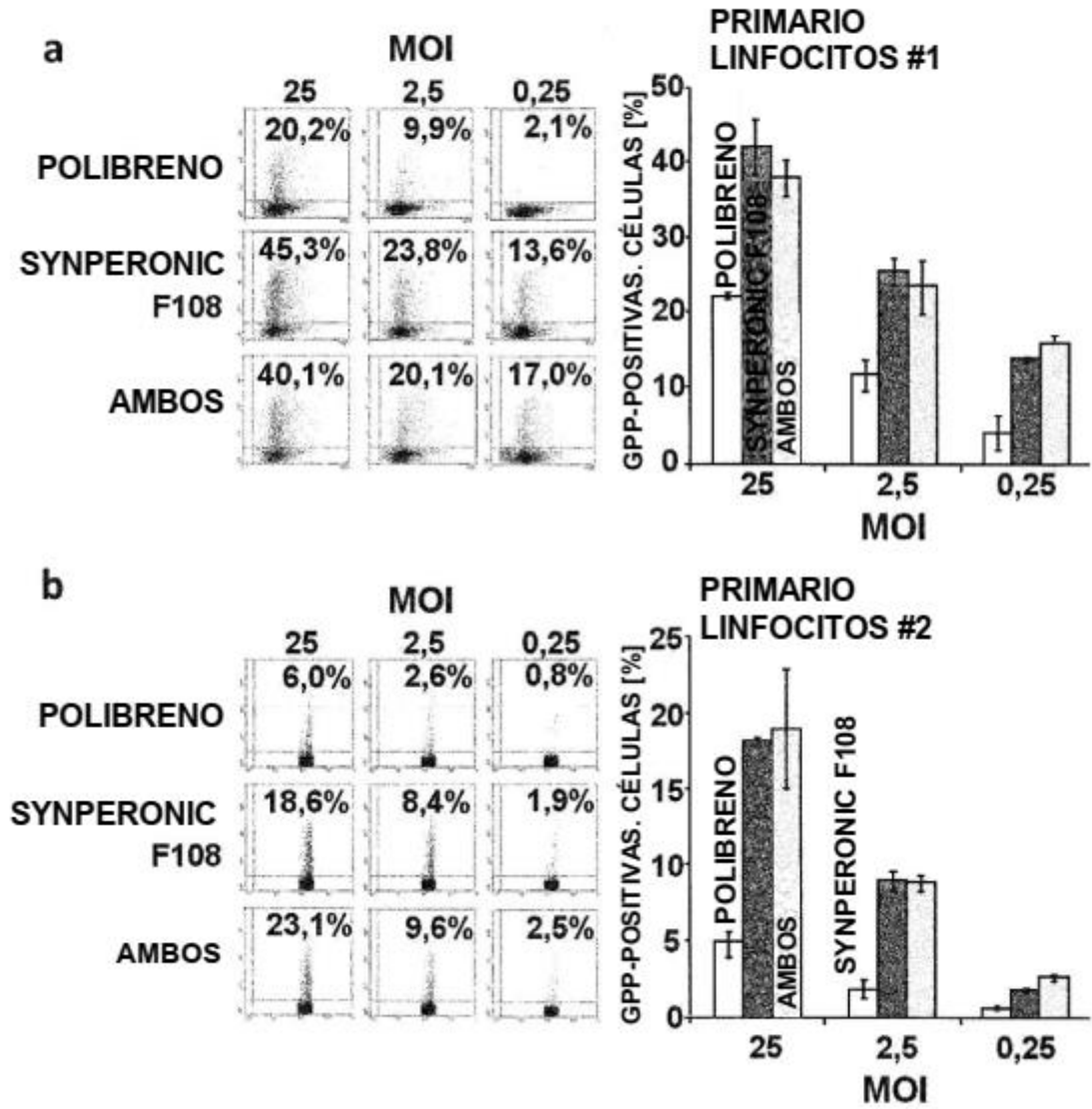


Figura 6

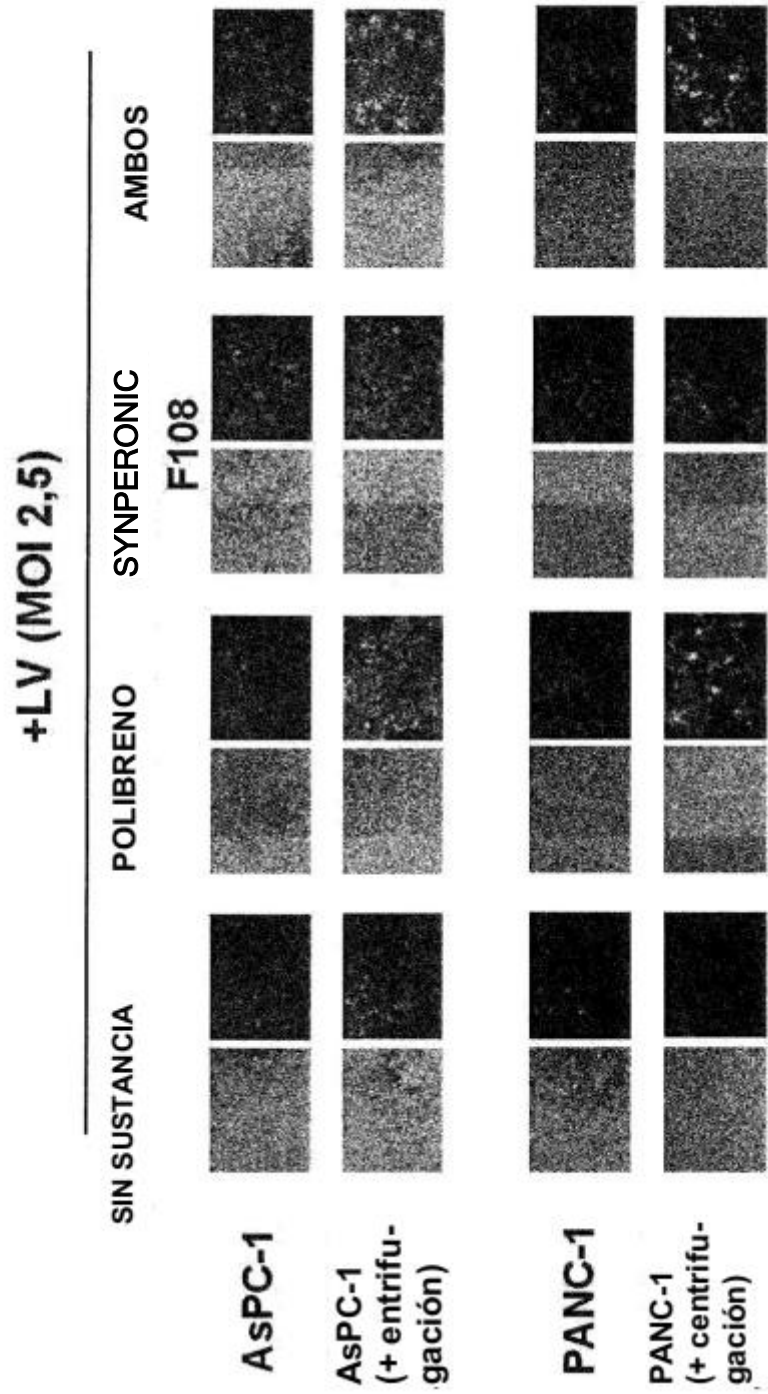


Figura 7

