

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 642 276**

51 Int. Cl.:

C12N 15/867 (2006.01)

C07K 14/15 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.09.2012** **PCT/EP2012/069230**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.04.2013** **WO13045639**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.09.2012** **E 12766315 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.07.2017** **EP 2761010**

54 Título: **Vectores lentivirales pseudotipados con glicoproteínas de envoltura BaEV mutantes**

30 Prioridad:

29.09.2011 EP 11306247

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

16.11.2017

73 Titular/es:

**INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET
DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (50.0%)
101 Rue de Tolbiac
75013 Paris, FR y
ECOLE NORMALE SUPERIEURE DE LYON
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**GIRARD-GAGNEPAIN, ANAIS;
VERHOEYEN, ELS;
LAVILLETTE, DIMITRI y
COSSET, FRANÇOIS-LOÏC**

74 Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

ES 2 642 276 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Vectores lentivirales pseudotipados con glicoproteínas de envoltura BaEV mutantes

5 **[0001]** La presente invención se refiere a vectores lentivirales pseudotipados que permiten una transferencia genética eficiente de células hematopoyéticas.

[0002] La terapia génica es prometedora para la curación de muchas enfermedades hereditarias y adquiridas como lo demuestra el éxito en el tratamiento de la inmunodeficiencia combinada grave ligada a X (SCID-X1), la
10 deficiencia de adenosina desaminasa (ADA) y la enfermedad granulomatosa crónica. Recientemente, se notificó el tratamiento exitoso de pacientes que padecían adrenoleucodistrofia ligada a X (ALD) usando vectores lentivirales. En este ensayo, la terapia génica basada en células madre hematopoyéticas (HSC) fue capaz de detener la progresión de la enfermedad en dos pacientes que padecían esta enfermedad desmielinizante mortal del sistema nervioso central. Es importante destacar que para la corrección de todos estos defectos del sistema hematopoyético,
15 el gen terapéutico debe administrarse a células capaces tanto de auto-renovarse como de diferenciarse en todos los linajes hematopoyéticos. Dado que las HSC responden a estos criterios que representan "los" candidatos atractivos para aplicaciones de terapia génica.

[0003] Sin embargo, una barrera principal en la transducción del vector lentiviral de HSC es que el 75 % de
20 HSC están residiendo en la fase G₀ del ciclo celular y no son muy permisivos para una transducción de vector lentiviral clásica. Esta limitación obstaculiza la aplicación de vectores lentivirales convencionales para la terapia génica de HSC, ya que no permiten una transferencia génica eficaces a una subpoblación de HSC inactivas (G₀) (Sutton et al. (1999) J. Virol. 73: 3649-3660). Para superar esta limitación, muchos estudios que usaban vectores lentivirales para la transducción de células hCD34⁺ emplearon una alta entrada de vector y la presencia de cócteles
25 de citocinas muy fuertes (TPO, SCF, Flk-3, IL-6, IL-3) para inducir la entrada del ciclo de HSC. Muy a menudo, la retronectina, un fragmento de fibronectina, se utiliza para colocalizar partículas de vector y las células diana o múltiples administraciones de vector se aplican para lograr altas tasas de transferencia génica en HSC. Sin embargo, un efecto no deseado de la estimulación prolongada de citocinas es una disminución de la potencialidad múltiple y el injerto a largo plazo de HSC humanas. Además, una dosis vectorial demasiado alta plantea el riesgo de
30 integración de múltiples copias, y en particular de mutagénesis de inserción.

[0004] Por lo tanto, existe la necesidad de vectores virales que permitan la transducción de HSC inactivas y que limiten el riesgo de integración de múltiples copias.

35 **[0005]** La transferencia eficiente de genes a linfocitos T y B inactivos para fines de terapia génica o inmunoterapia puede permitir el tratamiento de varias disfunciones genéticas del sistema hematopoyético, tales como inmunodeficiencias, y el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para cánceres y enfermedades adquiridas. Los vectores lentivirales (LV) no son capaces de transducir algunos tipos de células inactivas particulares tales como los linfocitos T y B en reposo (Bovia et al. (2003) Blood 101: 1727-1733; Verhoeyen et al. (2003) Blood
40 101: 2167-2174). En los linfocitos T, la finalización de la transcripción inversa, la importación nuclear y la posterior integración del genoma de los vectores lentivirales pseudotipados con la glicoproteína de la envoltura del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G) no se producen eficientemente a menos que se activen a través del receptor de linfocitos T o por las citocinas de supervivencia que las inducen a entrar en la fase G_{1b} del ciclo celular. La transducción lentiviral de linfocitos B es otra cuestión ya que incluso la proliferación que induce la estimulación del
45 receptor de linfocitos B (BCR) no es suficiente para permitir la transducción eficiente con vectores lentivirales pseudotipados con VSV-G (VSV-G-LV).

[0006] Por lo tanto, existe una importante necesidad de vectores virales que permitan la transducción de linfocitos T y B en reposo.

50 **[0007]** Con el fin de administrar genes mediante un vector lentiviral en células hematopoyéticas, es necesario que esté presente una proteína de envoltura "de entrada" que permita una fusión vector-célula eficaz en su superficie. El proceso de incorporación de una glicoproteína de envoltura heteróloga en el núcleo de un vector lentiviral se denomina "pseudotipaje". Durante mucho tiempo, se ha utilizado VSV-G asociado con núcleos víricos
55 derivados del VIH-1. Sin embargo, hay desventajas en el uso de VSV-G-LV. La toxicidad está asociada con la expresión a largo plazo de VSV-G, lo que dificulta la generación de líneas celulares estables. Además, los VSV-G-LV son sensibles al complemento humano, lo que los hace inadecuados para su uso *in vivo*. Sólo las dosis altas de VSV-G-LV (multiplicidad de infección = MOI de 50-100) permiten una transducción eficiente de células hCD34⁺ aumentando el riesgo de integración de múltiples copias y, por lo tanto, la genotoxicidad (Di Nunzio et al. (2007)

Hum. Gene Ther. 18: 811-820). Los seres humanos también pueden desarrollar fuertes respuestas inmunes contra VSV-G que pueden reducir la eficacia de una segunda administración de VSV-G-LV. Todas estas evidencias limitan el uso *ex vivo* e *in vivo* de VSV-G-LV.

5 **[0008]** La glicoproteína de envoltura quimérica que comprende los dominios extracelular y transmembrana de la glicoproteína de envoltura del virus de la leucemia felina RD114 fusionada a la cola citoplásmica (designada TR) de la glicoproteína de envoltura del virus A de la leucemia murina (MLV-A), denominada en el presente documento RD114/TR y descrita en la solicitud internacional WO 03/091442) parecía ser una envoltura bastante buena. De hecho, este pseudotipo no es sensible al sistema de complemento humano, lo que lo hace atractivo para
10 aplicaciones *in vivo*. RD114/TR-LV permiten la transducción eficiente de células CD34⁺ humanas y de macaco. Sin embargo, los niveles de transducción se mantienen muy por debajo de los de los VSV-G-LV y los títulos de RD114 son mucho más bajos que para VSV-G-LV. Adicionalmente, la glicoproteína RD114/TR no puede entrar eficientemente en las células murinas. Por lo tanto, esta especificidad del receptor limita las posibilidades de trabajo con este LV, ya que la mayoría de los modelos de enfermedad preclínica aptos para la terapia génica son modelos
15 de ratones.

[0009] La presente invención surge del hallazgo inesperado por parte de los inventores de que los vectores lentivíricos pseudotipados con una glicoproteína de envoltura quimérica que comprende o consiste en una fusión del dominio transmembrana y extracelular de una glicoproteína de envoltura de retrovirus endógeno de babuino (BaEV)
20 y el dominio de cola citoplásmica de una glicoproteína de envoltura del virus de la leucemia murina (MLV); o una glicoproteína de envoltura de BaEV modificada en la que el dominio de cola citoplásmica está desprovisto del péptido R inhibidor de la fusión, muestran propiedades de transducción particularmente adecuadas para la transferencia génica a células hematopoyéticas, incluyendo HSC y linfocitos T y B en reposo. De hecho, estos nuevos pseudotipos de LV pueden transducir células hCD34⁺ muy eficientes y estables hasta un 70 % a dosis
25 vectoriales bajas y tras una estimulación leve de citocinas. Los BaEV-LV superaron de lejos a VSV-G y RD114/TR-LV para la transducción de células CD34⁺ de macaco y humanas. Además, los inventores mostraron que los BaEV-LV transdujeron células hCD34⁺ progenitoras muy tempranas incluyendo HSC, ya que estas células fueron capaces de reconstituir un modelo de ratones inmunodeficientes y se encontró un alto nivel de células sanguíneas transducidas en varios tejidos hematopoyéticos y en aquellos tejidos en los diferentes linajes de células sanguíneas.
30 Es importante destacar que los BaEV-LV fueron capaces de transducir linfocitos T de memoria y sin tratar pre-estimulados de IL-7 a altos niveles. Además, a diferencia de los VSV-G-LV y RD114/TR-LV, estos BaEV-LV también permitieron la transducción de alto nivel de linfocitos B estimulados en reposo y BCR sin inducción de un cambio fenotípico.

35 **[0010]** Por lo tanto, la presente invención se refiere a una partícula de vector viral pseudotipado para transferir material biológico a las células, en la que dicha partícula de vector comprende al menos:

- una glicoproteína de envoltura quimérica que comprende o consiste en una fusión del dominio transmembrana y extracelular de una glicoproteína de envoltura de retrovirus endógeno de babuino (BaEV) y el dominio de cola
40 citoplásmica de una glicoproteína de envoltura del virus de leucemia murina (MLV); o
- una glicoproteína de envoltura de BaEV modificada en la que el dominio de la cola citoplásmica está desprovisto del péptido R inhibidor de la fusión.

[0011] La presente invención se refiere también a la partícula de vector viral pseudotipado de acuerdo con la
45 invención para su uso en el tratamiento de un trastorno hematopoyético.

[0012] Otro objeto de la invención se refiere a un medicamento que comprende una partícula de vector viral pseudotipado de acuerdo con la invención como principio activo.

50 **[0013]** La invención también se refiere al uso de una partícula de vector viral pseudotipado de acuerdo con la invención para transferir el material biológico en células hematopoyéticas *ex vivo*.

[0014] Otro objeto de la invención se refiere a un método *in vitro* para transducir una célula hematopoyética que comprende poner en contacto la célula hematopoyética con una partícula de vector viral pseudotipado de
55 acuerdo con la invención en condiciones para realizar la transducción de la célula hematopoyética por la partícula de vector viral pseudotipado.

[0015] La invención también se refiere a una línea celular de encapsidación de virus estable que produce la partícula de vector viral pseudotipado como se ha definido anteriormente, en la que la línea celular comprende (i) al

menos una primera secuencia de ácido nucleico que comprende un genoma derivado de retrovirus competente de encapsidación, (ii) al menos una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende un ADNc que codifica proteínas centrales de dicho retrovirus, y (iii) al menos una tercera secuencia de ácido nucleico que comprende un ADNc que codifica:

- 5 - una glicoproteína de envoltura quimérica que comprende o consiste en una fusión del dominio transmembrana y extracelular de una glicoproteína de envoltura de retrovirus endógeno de babuino (BaEV) y el dominio de cola citoplásmica de una glicoproteína de envoltura del virus de leucemia murina (MLV), como se ha definido anteriormente; o
- 10 - una glicoproteína de envoltura de BaEV modificada en la que el dominio de la cola citoplásmica está desprovisto del péptido R inhibidor de la fusión.

Descripción detallada de la invención

15 *Partícula de vector viral pseudotipado*

[0016] La presente invención se refiere a una partícula de vector viral pseudotipado para transferir material biológico a las células, en la que dicha partícula de vector comprende al menos:

- 20 - una glicoproteína de envoltura quimérica que comprende o consiste en una fusión del dominio transmembrana y extracelular de una glicoproteína de envoltura de retrovirus endógeno de babuino (BaEV) y el dominio de cola citoplásmica de una glicoproteína de envoltura del virus de leucemia murina (MLV); o
- una glicoproteína de envoltura de BaEV modificada en la que el dominio de la cola citoplásmica está desprovisto del péptido R inhibidor de la fusión.

- 25 **[0017]** Como se pretende en el presente documento, la expresión "partícula de vector" representa cualquier partícula susceptible de mostrar la glicoproteína de envoltura quimérica o la glicoproteína de envoltura de BaEV modificada en su superficie y de unirse de forma reversible a un material biológico. Se prefiere que tal partícula de vector de este tipo sea una partícula de vector viral, en particular, una partícula de vector retroviral. Preferiblemente,
- 30 dicha partícula de vector retroviral se selecciona del grupo que consiste en una partícula de vector oncoviral, incluyendo virus de la leucemia murina (MLV), virus de la leucosis aviar (ALV), virus sincitial respiratorio (RSV) o partículas de vector del virus del mono Mason-Pfizer (MPMV), una partícula de vector lentiviral, tal como virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), por ejemplo, VIH-1 o VIH-2, virus de la inmunodeficiencia del simio (SIV), virus de la inmunodeficiencia felina (FIV), virus de la anemia infecciosa equina (EIAV) y virus de la encefalitis de la artritis
- 35 caprina (CAEV), y una partícula de vector espumaviral tal como la partícula de vector del virus espumoso humano (HFV).

- [0018]** Las partículas del vector lentiviral se conocen bien por el experto en la técnica y se describen especialmente en Naldini et al. (2000) Adv. Virus. Res. 55: 599-609 y Negre et al. (2002) Biochimie 84: 1161-1171.
- 40 Usualmente, las partículas de vector lentiviral de acuerdo con la invención comprenden al menos los siguientes componentes: (i) un componente de envoltura, que está constituido por una bicapa fosfolipídica asociada a proteínas de envoltura, en donde las proteínas de envoltura comprenden al menos las glicoproteínas quiméricas o modificadas definidas anteriormente, rodeando dicha envoltura (ii) un componente de núcleo, constituido por la asociación de una proteína gag, rodeando dicho propio núcleo (iii) componentes genómicos, usualmente constituidos por ácidos
- 45 ribonucleicos (ARN), y (iv) un componente enzimático (pol). El material biológico puede estar presente dentro de la envoltura, dentro del núcleo y/o dentro de los componentes genómicos.

- [0019]** Las partículas de vector lentiviral pueden prepararse fácilmente por el experto en la técnica, por ejemplo, siguiendo la guía general proporcionada por Sandrin et al. (2002) Blood 100: 823-832. En resumen, las
- 50 partículas del vector lentiviral pueden ser generadas co-expresando los elementos de encapsidación (es decir, los componentes de núcleo y enzimáticos), el componente genómico y el componente de envoltura en una célula denominada productora, por ejemplo, células de riñón embrionario humano 293T. Típicamente pueden emplearse de tres a cuatro plásmidos, pero el número puede ser mayor dependiendo del grado en el que los componentes lentivirales se dividen en unidades separadas.

- 55 **[0020]** Como se usa en el presente documento, la expresión "vector viral pseudotipado" se refiere a un vector viral que comprende glicoproteínas de envoltura virales externas. Típicamente, los vectores víricos de acuerdo con la invención están pseudotipados con las glicoproteínas quiméricas o modificadas definidas anteriormente.

[0021] El retrovirus endógeno de babuino o BaEV es un retrovirus de tipo C presente en múltiples copias provirales en el ADN de babuinos. La glicoproteína de la envoltura de BaEV se describe particularmente en Benveniste et al. (1974) Nature 248: 17-20 y Todaro et al. (1974) Cell 2: 55-61.

5 **[0022]** En el contexto de la invención, la expresión "glicoproteína de envoltura de BaEV" se refiere a la forma de tipo silvestre de la glicoproteína de envoltura de BaEV o a un mutante de dicha glicoproteína de envoltura de BaEV de tipo silvestre que es al menos un 80 %, preferiblemente al menos un 85 %, aún preferiblemente al menos un 90 %, más preferiblemente al menos un 95 %, todavía más preferiblemente al menos un 99 % idéntica a dicha glicoproteína de la envoltura de BaEV de tipo silvestre, con la condición de que dicha glicoproteína mutante retenga
10 la capacidad de la glicoproteína de tipo silvestre de unión a y fusión con la membrana de células hematopoyéticas.

[0023] Típicamente, la glicoproteína de envoltura de BaEV de tipo silvestre está codificada por la secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO: 1. Preferiblemente, consiste en la secuencia SEQ ID NO: 2. Como se sabe por el experto en la técnica, la glicoproteína de envoltura de BaEV está constituida por un dominio de cola citoplásmica, un
15 dominio transmembrana y un dominio extracelular. Las regiones correspondientes al dominio de cola citoplásmica, al dominio transmembrana y al dominio extracelular en la secuencia de la glicoproteína de envoltura pueden determinarse fácilmente por el experto en la técnica. Típicamente, el dominio de cola citoplásmica se localiza entre los aminoácidos 530 a 564 de la glicoproteína de envoltura de BaEV de tipo silvestre. Preferiblemente, el dominio de cola citoplásmica de tipo silvestre de la glicoproteína de envoltura de BaEV comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3. Típicamente, el dominio transmembrana se localiza entre los aminoácidos 507 a 529 de la glicoproteína de envoltura de BaEV de tipo silvestre. Preferiblemente, el dominio transmembrana de tipo silvestre de la glicoproteína de envoltura de BaEV comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4. Típicamente, el dominio extracelular se localiza entre los aminoácidos 1 a 506 de la glicoproteína de envoltura de BaEV de tipo silvestre. Preferiblemente, el dominio extracelular de tipo silvestre de la glicoproteína de envoltura de
25 BaEV comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5.

[0024] En una realización particular de la invención, el dominio de cola citoplásmica de la glicoproteína de envoltura de BaEV está desprovisto del péptido R inhibidor de la fusión.

30 **[0025]** En el contexto de la invención, la expresión "péptido R inhibidor de la fusión" se refiere a la porción C-terminal del dominio de cola citoplásmica de la glicoproteína de envoltura que aloja una señal de endocitosis de tirosina -YXXL- y que se escinde por proteasa viral durante la maduración del virión, potenciando así la fusión de la membrana de la glicoproteína de envoltura. El péptido R inhibidor de la fusión de la glicoproteína de envoltura de BaEV se encuentra típicamente entre los aminoácidos 547 y 564 de la glicoproteína de la envoltura de BaEV de tipo
35 silvestre. Preferiblemente, el péptido R inhibidor de la fusión de la glicoproteína de envoltura de BaEV comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 6.

[0026] Por lo tanto, en una realización particularmente preferida, la glicoproteína de envoltura de BaEV modificada en la que el dominio de cola citoplásmica está desprovisto del péptido R inhibidor de fusión comprende o
40 consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7. Tal glicoproteína de envoltura de BaEV modificada se denomina en el presente documento en lo sucesivo "BaEVRLess".

[0027] En otra realización particular, el dominio de cola citoplásmica de la glicoproteína de envoltura de BaEV se reemplaza por el dominio de cola citoplásmica de una glicoproteína de envoltura del virus de la leucemia murina
45 (MLV).

[0028] La glicoproteína de envoltura del virus de la leucemia murina se describe notablemente en Ott et al. (1990) J. Virol. 64: 757-766. La glicoproteína de envoltura del virus de la leucemia murina es preferiblemente la de la cepa 4070A.

50 **[0029]** En el contexto de la invención, la expresión "glicoproteína de envoltura de MLV" se refiere a la forma de tipo silvestre de la glicoproteína de envoltura de MLV o a un mutante de dicha glicoproteína de envoltura de MLV de tipo silvestre que es al menos un 80 %, preferiblemente al menos un 85 %, aún preferiblemente al menos un 90 %, más preferiblemente al menos un 95 %, todavía más preferiblemente al menos un 99 % idéntica a dicha glicoproteína de la envoltura de MLV de tipo silvestre, con la condición de que dicha glicoproteína mutante conserve la capacidad de la glicoproteína de envoltura de tipo silvestre de interactuar con proteínas centrales virales, en particular con proteínas centrales lentivirales.

[0030] Las regiones correspondientes al dominio de cola citoplásmica en la secuencia de la glicoproteína de

envoltura pueden determinarse fácilmente por el experto en la técnica. Típicamente, el dominio de cola citoplásmica de la glicoproteína de envoltura de MLV se localiza entre los aminoácidos 622 y 654 de la glicoproteína de envoltura de MLV de tipo silvestre. Preferiblemente, el dominio de cola citoplásmica de tipo silvestre de la glicoproteína de envoltura de MLV comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8.

5

[0031] Por lo tanto, en una realización particularmente preferida, la glicoproteína de envoltura quimérica que comprende o consiste en una fusión del dominio transmembrana y extracelular de una glicoproteína de envoltura de BaEV y el dominio de cola citoplásmica de una glicoproteína de envoltura de MLV comprende o consiste en la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 9. Tal glicoproteína de envoltura quimérica se denomina en el presente documento en lo sucesivo "BaEV/TR".

10

[0032] Los inventores demostraron que las glicoproteínas BaEV/TR y BaEVRLess se incorporaron a un nivel más alto en la superficie lentiviral que la glicoproteína de BaEV de tipo silvestre.

15

[0033] Los inventores demostraron además que la co-presentación de citocinas específicas sobre las partículas de vectores virales permitía potenciar la transducción dirigida de células de interés.

[0034] Por lo tanto, en una realización particular, la partícula de vector viral de acuerdo con la invención puede mostrar además, preferiblemente en su superficie, al menos una citocina seleccionada del grupo que consiste en factor de células madre (SCF), trombopoyetina (TPO), IL -2, IL-15 e IL-7.

20

[0035] Preferiblemente, dicha al menos una citocina se selecciona del grupo que consiste en SCF humano, TPO humana, IL-2 humana, IL-15 humana e IL-7 humana.

25

[0036] En el contexto de la invención, la citocina puede ser una citocina de tipo silvestre o cualquier mutante de dicha citocina de tipo silvestre que sea al menos un 80 %, preferiblemente al menos un 85 %, todavía preferiblemente al menos un 90 %, más preferiblemente al menos un 95 %, aún más preferiblemente al menos un 99 % idéntica a dicha citocina de tipo silvestre, con la condición de que dicha citocina mutante presente esencialmente las mismas propiedades que la citocina de tipo silvestre de la que deriva.

30

[0037] La citocina SCF de tipo silvestre preferiblemente comprende o consiste en la secuencia SEQ ID NO: 10. La TPO de tipo silvestre preferiblemente comprende o consiste en la secuencia SEQ ID NO: 11. La IL-2 de tipo silvestre preferiblemente comprende o consiste en la secuencia SEQ ID NO: 12. La IL-7 de tipo silvestre preferiblemente comprende o consiste en la secuencia SEQ ID NO: 13. La IL-15 de tipo silvestre preferiblemente comprende o consiste en la secuencia SEQ ID NO: 14.

35

[0038] El porcentaje de identidad puede calcularse realizando una alineación global por pares basada en el algoritmo de alineación de Needleman-Wunsch para encontrar la alineación óptima (incluyendo huecos) de dos secuencias a lo largo de toda su longitud, por ejemplo, utilizando Needle, y utilizando la matriz BLOSUM62 con un penalidad de apertura de huecos de 10 y una penalización de extensión de huecos de 0,5.

40

[0039] En un aspecto particularmente preferido de la descripción, la partícula de vector viral pseudotipado de acuerdo con la invención se puede obtener o se obtiene mediante el método de producción descrito en la sección "Método para producir una partícula de vector viral pseudotipado" a continuación en el presente documento.

45

Material biológico

[0040] Las partículas de vectores virales pseudotipados de la invención son de particular interés para transferir materiales biológicos a células, en particular a células hematopoyéticas.

50

[0041] Por consiguiente, en un aspecto preferido de la descripción, las partículas de vectores virales pseudotipados como se definen anteriormente comprenden además un material biológico.

[0042] Como se pretende en el presente documento, la expresión "material biológico" se refiere a uno o más compuestos susceptibles de alterar la estructura y/o la función de una célula. Dentro del contexto de la presente invención, se prefiere que el material biológico sea uno o más ácidos nucleicos, que en el caso de las partículas de vector lentiviral pueden estar comprendidos dentro del genoma de la partícula de vector. El genoma comprende típicamente uno o más ácidos nucleicos, preferiblemente unidos a elementos genéticos necesarios para su expresión en la célula diana, tales como promotores y terminadores, flanqueados por elementos que actúan en cis

55

necesarios para la inclusión del genoma en el elemento de núcleo, su transcripción inversa en ácido desoxirribonucleico (ADN), la importación del genoma retrotranscrito en el núcleo de la célula diana y la integración del genoma retrotranscrito dentro del genoma de la célula diana.

5 **[0043]** Los ejemplos de ácidos nucleicos de interés incluyen genes de globina, factores de crecimiento hematopoyéticos, que incluyen eritropoyetina (EPO), las interleucinas (especialmente Interleucina-1, Interleucina-2, Interleucina-3, Interleucina-6, Interleucina-12, etc.) y los factores estimuladores de colonias (tales como el factor estimulante de colonias de granulocitos, el factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos o el factor estimulador de colonias de células madre), la integrina específica de plaquetas $\alpha\text{IIb}\beta_3$, genes de resistencia a
10 múltiples fármacos, los genes gp91 o gp 47 que son defectuosos en pacientes con enfermedad granulomatosa crónica (CGD), genes antivíricos que hacen que las células resistan a infecciones con patógenos tales como el virus de la inmunodeficiencia humana, genes que codifican los factores de coagulación sanguínea VIII o IX que están mutados en hemofilia, ligandos implicados en las respuestas inmunes mediadas por linfocitos T, receptores de antígeno de linfocitos B (inmunoglobulinas), la cadena γ común del receptor de interleucina, una combinación de
15 receptores de antígeno tanto de linfocitos T como B en solitario y/o en combinación con anticuerpos de cadena única (ScFv), IL2, IL12, TNF, interferón gamma, CTLA4, B7 y similares, genes expresados en células tumorales tales como Melana, genes MAGE (tales como MAGE-1, MAGE -3), P198, P1A, gp100, etc.

[0044] Como se pretende en el presente documento, "transferencia" se refiere a la capacidad de la partícula de vector para entregar inicialmente el material biológico a la membrana o el citoplasma de la célula diana, tras estar
20 unido a la célula diana. Después de la entrega, el material biológico puede trasladarse a otro compartimento de la célula.

[0045] Como se pretende en el presente documento, las células receptoras para el material biológico a
25 transferir, o células diana, se refieren a cualquier célula susceptible de estar unida por la partícula de vector definida anteriormente. Cuando la partícula del vector es una partícula del vector lentiviral, la célula diana se refiere a cualquier célula susceptible de ser transducida por la partícula de vector. Estas células son preferiblemente células hematopoyéticas, en particular células hematopoyéticas humanas.

30 *Células hematopoyéticas*

[0046] Como se usa en el presente documento, la expresión "célula hematopoyética" se refiere generalmente a células sanguíneas, tanto del linaje mieloide como del linaje linfóide. En particular, la expresión "célula hematopoyética" incluye células tanto indiferenciadas o mal diferenciadas tales como células madre
35 hematopoyéticas y células progenitoras, y células diferenciadas tales como linfocitos T, linfocitos B o células dendríticas. Preferiblemente, la célula hematopoyética se selecciona del grupo que consiste en células madre hematopoyéticas, células progenitoras CD34⁺, en particular células CD34⁺ de sangre periférica, células CD34⁺ progenitoras muy tempranas, células CD19⁺ progenitoras de linfocitos B, células CD13⁺ progenitoras mieloides, linfocitos T, linfocitos B, monocitos, células dendríticas, linfocitos B de cáncer, en particular células de leucemia
40 linfocítica crónica de linfocitos B (BCLL) y linfocitos B de linfoma de zona marginal (MZL), y timocitos.

[0047] Como se conoce por el experto en la técnica, cada célula hematopoyética se produce a partir de células madre hematopoyéticas de médula ósea.

45 **[0048]** Como se usa en el presente documento, la expresión "célula madre hematopoyética" o "HSC" se refiere a células capaces de reponer todos los tipos de células sanguíneas y de auto-renovarse. Las células madre hematopoyéticas pueden definirse en particular, como células que mantienen los niveles de linfocitos mieloides, T y B a niveles fuertemente detectables (típicamente más del 1 % de células sanguíneas periféricas) durante 16 semanas al inyectarse en la circulación de un ratón receptor con un sistema hematopoyético reducido (Schroeder
50 (2010) Cell Stem Cell 6: 203-207).

[0049] Como se usa en el presente documento, la expresión "célula progenitora CD34⁺" se refiere a una población heterogénea de células que incluye una subpoblación de HSC, células madre pluripotentes y células en las primeras etapas del linaje de compromiso. Las células progenitoras CD34⁺ migran continuamente hacia y desde
55 la médula ósea en animales adultos normales. Pueden diferenciarse para producir todos los linajes de células hematopoyéticas encontrados en la circulación. La expresión "célula CD34⁺ de sangre periférica" se refiere más particularmente a células CD34⁺ presentes en la sangre.

[0050] Los inventores pre-estimularon células progenitoras tempranas CD34⁺ humanas con un cóctel fuerte

de citocinas (SCF, TPO y Flt3-L) y las transdujeron partículas de vectores lentivirales pseudotipados con BaEV/TR y BaEVRLess. Demostraron que las partículas de vectores lentivirales pseudotipados podrían transducir eficazmente células progenitoras tempranas CD34⁺ humanas, en particular, en más del 70 % en presencia de retronectina.

5 **[0051]** Los inventores demostraron además que la alta transducción de células CD34⁺ humanas obtenida con partículas de vector lentiviral pseudotipado con BaEV/TR y BaEVRLess se debió a la transducción estable de progenitores a corto plazo. De hecho, no hubo diferencias significativas entre la proporción de células CD34⁺ transducidas por partículas de vector lentiviral de BaEV/TR y BaEVRLess después de una pre-estimulación de SCF/TPO y los progenitores clonogénicos derivados de ellas. Por el contrario, para las partículas de vector lentiviral
10 pseudotipado con VSV-G, la proporción de progenitores clonogénicos transducidos fue significativamente menor que la tasa de células CD34⁺ transducidas de las que se derivaron.

[0052] Como se usa en el presente documento, la expresión "célula progenitora CD34⁺ muy temprana" se refiere a un subgrupo de células CD34⁺ progenitoras que está enriquecido con HSC.

15 **[0053]** Como se usa en el presente documento, la expresión "células progenitoras CD19⁺ de linfocitos B" se refiere a una población de células de linaje B que expresan la superficie celular CD10, CD34 y CD19.

[0054] Como se usa en el presente documento, la expresión "célula CD13⁺ progenitora mieloides" se refiere a una población de células de linaje mieloides que expresan la superficie celular CD34 y CD13 y opcionalmente CD33.

[0055] Los inventores demostraron que las partículas de vectores lentivirales pseudotipados con BaEV/TR y BaEVRLess eran capaces de transducirse en progenitores hematopoyéticos de alta eficacia capaces de repoblar ratones inmunodeprimidos. Evaluaron la capacidad de reconstitución a largo plazo de estas células CD34⁺ humanas
25 transducidas por partículas de vector lentiviral pseudotipado en el modelo de ratones inmunodeficientes Rag2^{-/-} y ^{-/-} Balbc y el modelo de ratones NOD/SCID/γc^{-/-} (NSG). Demostraron que las células progenitoras CD34⁺ muy tempranas, así como las progenitoras CD19⁺ de linfocitos B y células CD13⁺ mieloides se transdujeron en la misma extensión por partículas de vector lentiviral pseudotipado con BaEV/TR y BaEVRLess de la invención a dosis de partículas de vector infecciosas bajas. Además, las células hCD34⁺ transducidas por BaEV/TR-LV y BaEVRLess-LV
30 dio lugar a altos niveles de reconstitución en la médula ósea y los niveles de transducción más altos de células de repoblación de SCID (hasta el 90 % de células CD45⁺ GFP⁺) en la médula ósea. También demostraron que estos altos niveles de transducción se mantuvieron en los ratones receptores primarios en todos los tejidos hematopoyéticos (médula ósea, timo y bazo). Se detectó una transducción equivalente de alto nivel para progenitores inmaduros (células hCD34⁺), células linfoides (CD19⁺) y células mieloides (CD13⁺ y CD14⁺) en la
35 médula ósea. Por el contrario, las partículas de vector lentiviral pseudotipado con VSV-G transdujeron progenitores CD34⁺ tempranas, progenitores mieloides CD13⁺ y monocitos a niveles mucho más bajos. Para las partículas de vector lentiviral pseudotipadas con RD114/TR, también se detectó una transducción baja de todos los diferentes linajes celulares de médula ósea. Se encontró una imagen idéntica para linfocitos T y B y monocitos en el bazo. Los RD114/TR-LV demostraron niveles de transducción variable de células de repoblación de SCID (que varían de 3,2-
40 76 % de células GFP⁺ CD45⁺).

[0056] Los inventores también mostraron que en el bazo y la médula ósea el porcentaje de células GFP⁺ hCD45⁺ se mantuvo o aumentó después del injerto secundario de las células hCD34⁺ aisladas de receptores primarios en ratones inmunodeficientes. Además, tanto para los BaEV/TR los como BaEVRLess-LV, se detectaron
45 altos niveles de células GFP⁺ hCD34⁺, células linfoides (CD19⁺) y mieloides (CD13⁺) en la médula ósea de estos ratones receptores secundarios y se detectaron porcentajes equivalentes de células GFP⁺ en estos diferentes linajes. Por lo tanto, los inventores mostraron que las células de repoblación de SCID reconstituyentes secundarias eran capaces de diferenciarse por multi-linaje y que las HSC humanas verdaderas se modificaron genéticamente a niveles elevados por los BaEV/TR- y BaEVRLess-LV.

50 **[0057]** Los inventores también mostraron que las partículas de vectores lentivirales pseudotipados con BaEV/TR y BaEVRLess permitieron la transducción eficiente de linfocitos T humanos, en particular de linfocitos T humanos prestimulados con IL-7. Estas partículas de vector lentiviral pseudotipado eran superiores sobre las partículas de vector lentiviral pseudotipado con VSV-G para las mismas dosis de vector en presencia de retronectina. Es importante destacar que, las partículas de vector lentiviral pseudotípicas de BaEV/TR y BaEVRLess
55 permitieron una transducción eficiente tanto de linfocitos T pre-estimulados sin tratar como IL-7 de memoria. De hecho, permitieron la transducción de linfocitos T estimulados con IL-7 sin comprometer su fenotipo nativo. De gran interés, también permitieron casi el 100 % de la transferencia génica de linfocitos T tras la estimulación del receptor de linfocitos T (TCR) a un MOI de 10.

[0058] Por lo tanto, en un aspecto particular de la descripción, la célula hematopoyética diana es un linfocito T, preferiblemente un linfocito T sin tratar o de memoria.

5 **[0059]** Las partículas de vector lentiviral pseudotipado con BaEV/TR y BaEVRLess también permitieron una transducción altamente eficiente del 20-30 % de los linfocitos B en reposo y, por lo tanto, superaron con mucho a las partículas de vector lentiviral pseudotipado con VSV-G o RD114/TR que no permitieron la transducción o permitieron una transducción muy baja de linfocitos B humanos en reposo. Además, tras la estimulación del receptor de linfocitos B (BCR), las partículas de vector lentiviral pseudotipadas de BaEV/TR y BaEVRLess transdujeron hasta el
10 70 % de los linfocitos B mientras que las partículas de vector lentiviral pseudotipado con eficiencia de transducción de VSV-G no supera el 5 %. De forma importante, los linfocitos B de memoria así como sin tratar se transdujeron eficientemente por partículas de vector lentiviral pseudotipado con BaEV/TR y BaEVRLess.

[0060] Por lo tanto, en una realización particular, la célula hematopoyética diana es un linfocito B, en particular un linfocito B en reposo, preferiblemente un linfocito B se sin tratar o de memoria. También puede ser un linfocito B de cáncer, en particular una célula de leucemia linfocítica crónica de linfocitos B (BCLL) o un linfocito B de linfoma de zona marginal (MZL).

[0061] Debido al valor potencial de la transferencia génica de timocitos para la modulación inmune, los
20 inventores evaluaron el rendimiento de los BaEVgp-LV en comparación con los otros pseudotipos de LV para la transducción de diferentes subpoblaciones de timocitos. Tras el aislamiento de los timocitos de un timo humano, los transdujeron en presencia de la citocina de supervivencia IL-7 con VSV-G-, RD114/TR-, BaEV/TR- y BaEVRLess-LV que codifican el indicador de GFP en un MOI de 10. Los inventores demostraron que los RD114/TR-LV, BaEV/TR-LV y BaEVRLess-LV permiten la transducción preferencial de los timocitos en las primeras etapas de desarrollo
25 (células dobles negativas e individuales positivas inmaduras CD4), mientras que aún transducen los más maduros hasta un nivel inferior. Como ya se detectó para los linfocitos T humanos adultos, los BaEVgp LV transdujeron todas las diferentes subpoblaciones de timocitos más eficientemente que los RD114/TR-LV. Además, la transducción con los diferentes pseudotipos de vectores lentivirales no tuvo ningún efecto sobre la distribución de diferentes subpoblaciones de timocitos. Por lo tanto, los inventores demostraron que los BaEVgp-LV son excelentes
30 herramientas para la transducción de timocitos y que son especialmente superiores a VSV-G- y RD114/TR-LV para la transducción de las subpoblaciones de timocitos de células negativas dobles inmaduras (DN) y positivas individuales inmaduras CD4 (ISP).

[0062] Por lo tanto, en una realización particular, la célula hematopoyética diana es un timocito.
35

[0063] Finalmente, los inventores pre-estimularon linfocitos T CB totales recién aislados con la citocina de supervivencia de linfocitos T IL-7 para conservar el fenotipo sin tratar de linfocitos T, y posteriormente se transdujeron con los diferentes vectores: Los VSV-G-, RD114/TR-, BaEV/TR - y BaEVRLess-LV que codificaron el indicador de GFP en un MOI de 10 o 20, o en un MOI de 50 para VSV-G-LV. Demostraron que los BaEV/TR- y
40 BaEVRLess-LV presentan una eficiencia de transducción muy superior (40-50 % de transducción) a un MOI = 10 en comparación con VSV-G o RD114/TR-LV. Es importante destacar que los BaEV/TR- y BaEVRLess-LV alcanzaron fácilmente el 65 % de transducción cuando la dosis vectorial fue 2 veces mayor (MOI = 20). En todos los casos, los emigrantes de timocitos recientes sin tratar (CD69L+ CD45RA+ CD31+) se transdujeron en la misma medida que los linfocitos T CB sin tratar más maduros (CD69L+ CD45RA+ CD31-). Además, la transducción no tuvo ningún efecto
45 sobre la distribución de estas dos poblaciones de linfocitos T CB sin tratar.

[0064] Por lo tanto, en un aspecto particular de la descripción, la célula hematopoyética diana es una célula sin tratar. Como se usa en el presente documento, la expresión "célula sin tratar" se refiere a una célula que todavía no ha sido sometida a activación celular en respuesta a un estímulo. En particular, una "célula sin tratar" puede ser
50 una célula que todavía no ha sido expuesta a un antígeno.

[0065] Puesto que una fuerte estimulación con un cóctel de citocinas induce la diferenciación de HSC y su pérdida de capacidad de auto-renovación, es de particular interés pre-estimular las células lo menos posible, evitar su diferenciación tanto como sea posible y mantener elevadas sus "características de células madre".
55

[0066] Los inventores aplicaron los vectores virales pseudotipados de la invención a un MOI fijo (número de partículas infecciosas por célula) de 10 y diferentes protocolos de pre-estimulación de citocinas en células progenitoras tempranas CD34⁺ humanas: 1) ninguna estimulación; 2) estimulación con SCF o TPO; 3) estimulación con SCF y TPO; 4) estimulación con SCF, TPO y Flt3-L. Es importante destacar que, el cóctel de pre-estimulación

de citocinas más fuerte usado fue menor que los cócteles de pre-estimulación utilizados actualmente en el entorno clínico con el objetivo de limitar la diferenciación celular. Los inventores demostraron que las partículas de vectores lentivirales de BaEV/TR y BaEVRLess fueron capaces de transducir el 10-20 % de células progenitoras tempranas CD34⁺ humanas no estimuladas, mientras que los vectores lentivirales pseudotipados con VSV-G o RD114/TR (como se describe en la solicitud internacional WO2009/013324) fueron incapaces de transducir las células progenitoras tempranas CD34⁺ humanas inactivas no estimuladas eficientemente a las mismas dosis de vector. Además, una única estimulación de TPO fue suficiente para una transducción de células progenitoras tempranas CD34⁺ humanas de hasta el 60 % para vectores lentivirales pseudotipados con BaEV/TR y BaEVRLess, mientras que los vectores lentivirales pseudotipados con VSV-G o RD114/TR sólo transdujeron del 8 al 20 % de las células CD34⁺ progenitoras tempranas humanas bajo estas condiciones. La pre-estimulación individual de SCF permitió hasta el 30-50 % de transducción de células progenitoras tempranas CD34⁺ humanas con vectores lentivirales pseudotipados con BaEV/TR y BaEVRLess, mientras que los vectores lentivirales pseudotipados con VSV-G o RD114/TR únicamente alcanzaron niveles de transducción del 10 %. Finalmente, una combinación de TPO y SCF o de pre-estimulación de TPO, SCF y Flt3-L con una única incubación de vector lentiviral pseudotipado de BaEV/TR o BaEVRLess dio como resultado hasta el 75 % de transducción de células progenitoras tempranas CD34⁺ humanas, mientras que los vectores lentivirales pseudotipados con RD114/TR solamente logró el 40 % de transducción.

[0067] Por consiguiente, en una realización preferida, la célula hematopoyética diana no se pre-estimula con al menos una citocina. En particular, no se pre-estimula con SCF, TPO y/o Flt3-L.

[0068] En otro aspecto preferido de la descripción, la célula hematopoyética diana sólo se pre-estimula con SCF o TPO. En aún otro aspecto preferido, la célula hematopoyética diana sólo se pre-estimula con SCF y TPO.

[0069] Como se usa en el presente documento, el término "pre-estimulación" o "pre-estimulado" significa que la célula hematopoyética se pone en contacto con al menos una citocina a una concentración o durante un período adecuado para inducir una activación específica de la célula hematopoyética.

[0070] Como se usa en el presente documento, las expresiones "ligando del receptor 3 de tirosina cinasa de tipo tipo fms", "ligando Flt3" o "Flt3-L" se refiere a una citocina que aumenta el número de células inmunes activando los progenitores hematopoyéticos. Flt3-L es preferiblemente Flt3-L humano y más preferiblemente comprende o consiste en la secuencia SEQ ID NO: 15.

Método para producir una partícula de vector viral pseudotipado

[0071] La presente invención también se refiere a un método para producir una partícula de vector viral pseudotipado que comprende:

a) transfectar una célula con:

(i) al menos una primera secuencia de ácido nucleico que comprende un genoma de origen retroviral capaz de encapsidarse;

(ii) al menos una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende un ADNc que codifica proteínas centrales de dicho retrovirus, y

(iii) al menos una tercera secuencia de ácido nucleico que comprende un ADNc que codifica:

una glicoproteína de envoltura quimérica que comprende o consiste en una fusión del dominio transmembrana y extracelular de una glicoproteína de envoltura de retrovirus endógeno de babuino (BaEV) y el dominio de cola citoplásmica de una glicoproteína de envoltura del virus de leucemia murina (MLV), como se ha definido anteriormente; o

una glicoproteína de envoltura de BaEV modificada en la que el dominio de la cola citoplásmica está desprovisto del péptido R inhibidor de la fusión, como se ha definido anteriormente;

para producir una célula productora;

b) mantener la célula productora en cultivo durante el tiempo suficiente para permitir la expresión de los ADNc para producir las proteínas codificadas; y

c) permitir que las proteínas codificadas formen partículas de vector viral de la invención.

[0072] Por "retrovirus" se entiende un virus cuyo genoma consiste en una molécula de ARN y que comprende

una transcriptasa inversa, es decir, un miembro de la familia de *Retroviridae*. Los retrovirus se dividen en Oncovirus, Lentivirus y Spumavirus. Preferiblemente, dicho retrovirus es un oncovirus, por ejemplo, MLV, ALV, RSV, o MPMV, un lentivirus, por ejemplo, VIH-1, VIH-2, SIV, EIAV, o CAEV, o un spumavirus tal como HFV. Los genomas de estos retrovirus están fácilmente disponibles en bancos de datos. Más preferiblemente, dicho retrovirus es un lentivirus, en particular VIH-1, VIH-2 o SIV.

[0073] En el contexto de la invención, "una secuencia nucleica que comprende un genoma derivado de retrovirus capaz de encapsidarse" está destinada a una secuencia que comprende las secuencias de ácido nucleico retroviral conocidas como secuencias "de actuación en cis". Estas incluyen las repeticiones terminales largas (LTR) para el control de la transcripción e integración, la secuencia psi necesaria para la encapsidación, y las secuencias del sitio de unión al cebador (PBS) y de seguimiento de polipurina (PPT) necesarias para la transcripción inversa del genoma retroviral. Ventajosamente, dicha secuencia de ácido nucleico que comprende un genoma derivado de retrovirus capaz de encapsidarse comprende además un transgén.

[0074] Dicho genoma retroviral puede ser defectuoso para la replicación o capaz de replicarse, en ausencia de cualquier función de complementación de trans. Un genoma competente para la replicación comprenderá además los genes retrovirales gag, pol y env. En un genoma defectuoso para la replicación, se suprimen los genes virales gag, pol y env. Sin embargo, el ensamblaje de las partículas de vectores virales de la invención puede conseguirse proporcionando en trans otro plásmido que codifica la glicoproteína gag, pol y/o env pero que es defectuosa para las secuencias "cis". Su expresión permite la encapsidación del transgén, excluyendo los genes necesarios para la multiplicación del genoma viral y para la formación de partículas virales completas.

[0075] La "proteína central de un retrovirus" se refiere a proteínas codificadas por los genes gag y pol. El gen gag codifica una poliproteína que es procesada adicionalmente por la proteasa retroviral en proteínas estructurales que comprenden el núcleo. El gen pol codifica la proteasa retroviral, la transcriptasa inversa y la integrasa.

[0076] Con el propósito de la transfección, dichas primera, segunda y tercera secuencias de ácido nucleico pueden transportarse en un mismo vector, o en dos o tres vectores separados. Generalmente, un plásmido codifica el componente retroviral de núcleo de la partícula del vector viral. El origen de los genes gag y pol da su nombre a la partícula del vector viral. Por ejemplo, la expresión "partícula de vector derivada de VIH-1" indica usualmente que los genes gag y pol de la partícula de vector son los de VIH-1.

[0077] El término "transfección" se refiere a la introducción de un ácido nucleico extraño (ADN, ADNc o ARN) en una célula de manera que la célula huésped expresará el gen o secuencia introducida para producir una sustancia deseada, típicamente una proteína codificada por el gen o la secuencia introducida. El gen introducido puede incluir secuencias reguladoras o de control, tales como de inicio, parada, promotora, de señal, de secreción u otras secuencias utilizadas por la maquinaria genética de una célula. Se ha "transfectado" una célula huésped que recibe y expresa ADN o ARN introducido.

[0078] Para la producción de partículas de vector, se puede emplear cualquier célula que sea compatible con la expresión de genes Gag y Pol lentivirales, o cualquier célula que pueda ser diseñada para soportar tal expresión. Por ejemplo, pueden usarse células productoras tales como células 293T y células de insecto (en particular para vectores derivados de VIH), TE 671 y HT1080 (en particular para vectores derivados de MLV).

45 *Aplicaciones terapéuticas*

[0079] La presente invención también se refiere a un medicamento que comprende una partícula de vector viral pseudotipado como se ha definido anteriormente como principio activo, en particular una partícula de vector viral pseudotipado como se ha definido anteriormente, que comprende además un material biológico que es preferiblemente uno o más ácidos nucleicos. La descripción también se refiere a una composición farmacéutica que comprende una partícula de vectores virales pseudotipados como se ha definido anteriormente, en particular una partícula de vectores virales pseudotipados como se ha definido anteriormente que comprende además un material biológico que es preferiblemente uno o más ácidos nucleicos, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

[0080] La presente descripción también se refiere a un método para tratar un sujeto que lo necesite que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una partícula de vector viral pseudotipado como se ha definido anteriormente, en particular una partícula de vector viral pseudotipado como se ha definido anteriormente que comprende además un material biológico que es preferiblemente uno o más ácidos nucleicos, al sujeto que lo necesite.

[0081] En el contexto de la presente descripción, un "sujeto" representa un mamífero humano o no humano, tal como un roedor (rata, ratón, conejo), un primate (chimpancé), un felino (gato), un canino (perro). Preferiblemente, el sujeto es un ser humano.

[0082] Como se usa en el presente documento, la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un vehículo que se puede administrar a un paciente, junto con un vector viral de esta invención, y no destruye su actividad farmacológica y es no tóxico al administrarse en dosis suficientes para administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz del vector viral.

[0083] Los portadores y vehículos farmacéuticamente aceptables que se pueden usar en las composiciones farmacéuticas de esta invención incluyen, pero sin limitación, intercambiadores iónicos, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, sistemas de administración de fármacos autoemulsionantes (SEDDS) tal como d- α -tocopherol polietilenglicol 1000 succinato, tensioactivos utilizados en formas de dosificación farmacéuticas tales como Tweens u otras matrices de administración poliméricas similares, proteínas de suero, tal como albúmina sérica humana, sustancias tampón tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina, hidrogenofosfato disódico, hidrogenofosfato de potasio, cloruro sódico, sales de cinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias a base de celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa sódica, poliacrilatos, ceras, polímeros de bloque de polietileno-polioxiopropileno, polietilenglicol y lanolina. También se pueden utilizar ventajosamente ciclodextrinas tales como α , β y γ -ciclodextrina, o derivados modificados químicamente tales como hidroxialquilciclodextrinas, incluyendo 2 y 3-hidroxipropil- β -ciclodextrinas, u otros derivados solubilizados para mejorar la administración de composiciones de acuerdo con la descripción. Puede utilizarse cualquier método de administración adecuado conocido por un experto en la técnica. En particular, la partícula de vector viral pseudotipado de acuerdo con la invención puede administrarse, por ejemplo, por vía oral o por vía parenteral (en particular por inyección intravenosa e inyección intrafemoral (cavidad de la médula ósea). Cuando se selecciona la ruta parenteral, las partículas de vectores virales pseudotipados pueden estar en forma de soluciones inyectables y suspensiones, acondicionadas en ampollas o matraces. Las formas para administración parenteral se obtienen convencionalmente mezclando las partículas de vectores virales pseudotipados de acuerdo con la invención con tampones, estabilizadores, conservantes, agentes solubilizantes, agentes isotónicos y agentes de suspensión. De acuerdo con técnicas conocidas, estas mezclas pueden esterilizarse entonces y acondicionarse en forma de inyecciones intravenosas. Un experto en la técnica puede usar tampones a base de sales de fosfato orgánicas como tampón. Los ejemplos de agentes de suspensión incluyen metilcelulosa, goma arábiga y carboximetilcelulosa sódica. Los ejemplos de estabilizantes incluyen sulfito de sodio y metasulfito de sodio, y los ejemplos de conservantes incluyen p-hidroxibenzoato de sodio, ácido sórbico, cresol y clorocresol.

[0084] Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un vector viral que confiere un efecto terapéutico al sujeto tratado. El efecto terapéutico puede ser objetivo (es decir, medible por alguna prueba o marcador) o subjetivo (es decir, el sujeto da una indicación o siente un efecto). Como se conoce por el experto en la técnica, las dosis eficaces variarán dependiendo de la vía de administración, el tamaño y/o peso del sujeto, así como de la posibilidad de uso concomitante con otros agentes.

[0085] Cuando se utiliza la partícula del vector viral pseudotipado como medicamento y se administra a un sujeto en un método terapéutico, se prefiere la administración a través de la vía intravenosa o por la vía medular, en particular la vía medular del fémur o húmero. Para la administración intravenosa se puede usar una dosis unitaria de aproximadamente $5 \cdot 10^8$ a aproximadamente 10^9 partículas de vectores virales pseudotipados como se ha definido anteriormente, mientras que para la administración medular puede usarse una dosis unitaria de aproximadamente 10^8 a aproximadamente $5 \cdot 10^8$ partículas de vector viral pseudotipado como se ha definido anteriormente.

[0086] En una realización particular, la partícula de vector viral pseudotipado de la invención es para su uso en el tratamiento de un trastorno hematopoyético o una enfermedad autoinmune.

[0087] La presente descripción también se refiere al uso de una partícula de vectores virales pseudotipados como se ha definido anteriormente para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento de un trastorno hematopoyético o una enfermedad autoinmune. También se refiere a un método para tratar un trastorno hematopoyético o una enfermedad autoinmune, en un sujeto que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una partícula de vector viral pseudotipado de la invención en un sujeto que lo necesite.

[0088] Como se usa en el presente documento, la expresión "trastorno hematopoyético" se refiere a una

enfermedad de la sangre, en particular a una enfermedad que afecta a las células hematopoyéticas. Preferiblemente, dicho trastorno hematopoyético es una enfermedad hematopoyética monogénica.

[0089] Como se usa en el presente documento, la expresión "enfermedad hematopoyética monogénica" se refiere a una enfermedad hematopoyética genética, que se debe a la mutación de un único gen.

[0090] Los ejemplos de trastornos hematopoyéticos incluyen mielodisplasia, anemia aplásica, anemia de Fanconi, hemoglobinuria nocturna paroxística, anemia de células falciformes, anemia de Diamond Blackfan, trastorno de Schachman Diamond, síndrome de Kostmann, enfermedad granulomatosa crónica, adrenoleucodistrofia, deficiencia de adhesión leucocitaria, hemofilia, talasemia, beta-talasemia, leucemia tal como leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia mielógena aguda (mieloide) (AML), leucemia linfoblástica adulta, leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia linfocítica crónica de linfocitos B (B-CLL), leucemia mieloide crónica (CML), leucemia mielógena crónica juvenil (CML), y leucemia mielomonocítica juvenil (JMML), enfermedad de inmunodeficiencia combinada grave (SCID), inmunodeficiencia combinada grave ligada a X, síndrome de Wiskott-Aldrich (WAS), deficiencia de adenosina-desaminasa (ADA), enfermedad granulomatosa crónica, síndrome de Chediak-Higashi, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin (NHL) y sida.

[0091] Preferiblemente, el trastorno hematopoyético se selecciona del grupo que consiste en anemia de Fanconi, hemofilia, beta-talasemia, síndrome de Wiskott-Aldrich, inmunodeficiencia combinada grave unida al cromosoma, deficiencia de adenosina-desaminasa, enfermedad granulomatosa crónica y adrenoleucodistrofia.

[0092] Como se usa en el presente documento, la expresión "enfermedad autoinmune" se refiere a una enfermedad debida a una respuesta inmune hiperactiva del cuerpo frente a sustancias y tejidos normalmente presentes en el cuerpo. Por consiguiente, al dirigir específicamente las células inmunes (hematopoyéticas) implicadas en esta respuesta inmune hiperactiva, las partículas de vector de la invención podrían ser herramientas útiles en el tratamiento de enfermedades autoinmunes.

[0093] Las enfermedades autoinmunes incluyen en particular la encefalomiелitis aguda diseminada, la leucoencefalitis aguda hemorrágica, la enfermedad de Addison, la agammaglobulinemia, la alopecia areata, la esclerosis lateral amiotrófica, la espondilitis anquilosante, el síndrome antifosfolípido, el síndrome antisintetasa, la alergia atópica, la anemia aplásica autoinmune, la miocardiopatía autoinmune, la enteropatía autoinmune, la anemia hemolítica autoinmune, la hepatitis autoinmune, la enfermedad del oído interno autoinmune, el síndrome linfoproliferativo autoinmune, la neuropatía periférica autoinmune, la pancreatitis autoinmune, el síndrome poliendocrino autoinmune, dermatitis autoinmune por progesterona, la púrpura trombocitopénica autoinmune, la urticaria autoinmune, la uveítis autoinmune, la enfermedad de Balo, la esclerosis de Balo, el síndrome de Bechets, la enfermedad de Berger, la encefalitis de Bickerstaff, síndrome de Blau, penfigoide ampolloso, cáncer, enfermedad de Castleman, enfermedad celíaca, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, osteomielitis multifocal recurrente crónica, síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial, síndrome de Cogan, enfermedad aglutinina fría, deficiencia del componente 2 del complemento, arteritis craneal, síndrome de CREST, enfermedad de Crohn, síndrome de Cushing, angiitis leucocitoclástica cutánea, enfermedad de Dego, enfermedad de Dercum, dermatitis herpetiformis, dermatomiositis, diabetes mellitus tipo 1, esclerosis sistémica cutánea difusa, síndrome de Dressler, lupus eritematoso discoide, eccema, artritis relacionada con entesitis, fascitis eosinofílica, gastroenteritis eosinofílica, epidermolisis ampollosa adquirida, eritema nodoso, crioglobulinemia mixta esencial, síndrome de Evan, fibrodisplasia osificante progresiva, alveolitis fibrosante, gastritis, penfigoide gastrointestinal, arteritis de células gigantes, glomerulonefritis, síndrome de goodpasture, enfermedad de Grave, síndrome de Guillain-Barré (GBS), encefalitis de Hashimoto, tiroiditis de Hashimoto, anemia hemolítica, púrpura de Henoch-Schonlein, herpes gestationis, hipogammaglobulinemia, enfermedad desmielinizante inflamatoria idiopática, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática, nefropatía por IgA, miositis por cuerpos de inclusión, polineuropatía desmielinizante inflamatoria, cistitis intersticial, artritis idiopática juvenil, artritis reumatoide juvenil, enfermedad de Kawasaki, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, vasculitis leucocitoclástica, liquen plano, liquen escleroso, enfermedad por IgA lineal (LAD), enfermedad de Lou Gehrig, hepatitis lupoide, lupus eritematoso, síndrome de Majeed, enfermedad de Ménière, poliangiitis microscópica, síndrome de Miller-Fisher, enfermedad del tejido conectivo mixto, morfea, enfermedad de Mucha-Habermann, esclerosis múltiple, miastenia gravis, miositis, neuropielitis óptica, neuromiotonia, penfigoide cicatricial ocular, síndrome de opsoclono-mioclono, tiroiditis de ord, reumatismo palindrómico, degeneración cerebelar paraneoplásica, hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH), síndrome de Parry Romberg, síndrome de Parsonage-Turner, pars planitis, pénfigo vulgar, anemia pernicioso, encefalomiелitis perivenosa, síndrome de POEMS, poliarteritis nodosa, polimialgia reumática, polimiositis, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, neuropatía inflamatoria progresiva, psoriasis, artritis psoriásica, pioderma gangrenoso, aplasia pura de células rojas, encefalitis de Rasmussen, fenómeno de Raynaud, policondritis

recidivante, síndrome de Reiter, síndrome de piernas inquietas, fibrosis retroperitoneal, artritis reumatoide, fiebre reumatoide, sarcoidosis, síndrome de Schmidt, síndrome de Schnitzler, escleritis, escleroderma, síndrome de Sjögren, espondilartropatía, enfermedad de Still, síndrome de persona rígida, endocarditis bacteriana subaguda, síndrome de Susac, síndrome de Sweet, corea de Sydenham, oftalmia simpática, arteritis de Takayasu, arteritis temporal, síndrome de Tolosa-Hunt, mielitis transversa, colitis ulcerosa, enfermedad de tejido conectivo no diferenciada, espondiloartropatía no diferenciada, vasculitis, vitíligo y granulomatosis de Wegener.

10 **[0094]** Preferiblemente, la enfermedad autoinmune se selecciona de cáncer, diabetes, hemofilia, uveítis y encefalomiелitis.

[0095] Como se usan en el presente documento, el término "cáncer" incluye cualquier tipo de cáncer, pero incluye preferiblemente cánceres que surgen de células hematopoyéticas, incluyendo leucemia, en particular B-CLL, CML o leucemia a base de linfocitos T, tal como ALT, así como melanoma.

15 *Métodos de transducción*

[0096] La presente invención se refiere también al uso de una partícula de vector viral pseudotipado como se ha definido anteriormente, para transferir un material biológico como se define en la sección "*Material biológico*" anterior, en las células hematopoyéticas como se define en la sección "*Células hematopoyéticas*" anterior, *ex vivo*.

20 **[0097]** Otro objeto de la invención se refiere a un método *in vitro* para transducir una célula hematopoyética como se define en la sección "*Células hematopoyéticas*" anterior, que comprende poner en contacto la célula hematopoyética con una partícula de vector viral pseudotipado como se ha definido anteriormente en condiciones para efectuar la transducción de la célula hematopoyética por la partícula del vector viral pseudotipado.

25 **[0098]** Como se pretende en el presente documento, "transferencia" o "transducción" se refiere a la capacidad de la partícula de vector viral para entregar inicialmente el material biológico a la membrana o al citoplasma de la célula diana, tras estar unido a la célula diana. Después de la entrega, el material biológico puede trasladarse a otro compartimento de la célula.

30 **[0099]** Las condiciones para efectuar la transducción de las células diana se conocen bien por el experto en la técnica e incluyen típicamente incubar las células a transducir, preferiblemente cultivadas en matraces o placas recubiertas con retronectina, y opcionalmente pre-estimuladas con cócteles de citocinas, con las partículas de vectores virales pseudotipados de la invención, preferiblemente a un MOI de 1, 5, 10 o 100, preferiblemente en medio libre de suero.

Línea celular de encapsidación

40 **[0100]** La invención se refiere también a una línea de células de encapsidación de virus estable que produce la partícula de vector viral pseudotipado como se ha definido anteriormente, preferiblemente la producción de la partícula de vector viral pseudotipo comprende al menos una glicoproteína de envoltura química que comprende o consiste en una fusión del dominio transmembrana y extracelular de una glicoproteína de envoltura de BaEV y el dominio de cola citoplásmica de una glicoproteína de envoltura de MLV.

45 **[0101]** De hecho, los inventores demostraron que la glicoproteína BaEV/TR no era citotóxica para las células productoras 293T.

50 **[0102]** En el contexto de la invención, una línea celular de encapsidación de virus estable se refiere a una línea celular que expresa de manera estable los diferentes componentes de la partícula de vectores virales pseudotipados de la invención. Típicamente, los ácidos nucleicos que codifican los diferentes componentes de la partícula de vector viral pseudotipado de la invención están integrados en el genoma de la línea celular.

55 **[0103]** En particular, dicha línea celular de encapsidación de virus estable puede ser cualquier célula que sea compatible con la expresión de genes Gag y Pol lentivirales, o cualquier célula que pueda diseñarse para soportar dicha expresión. Por ejemplo, pueden ser células 293T, y células de insecto (en particular para vectores derivados de VIH), TE 671 y HT1080 (en particular para vectores derivados de MLV).

[0104] La presente invención se ilustrará adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos.

Breve descripción de las figuras

[0105]

- 5 La **Figura 1** muestra la representación esquemática de la glicoproteína de tipo silvestre BaEV, las glicoproteínas quiméricas RD114/TR y BaEV/TR y la glicoproteína BaEVRless. El dominio citoplásmico de la glicoproteína de tipo silvestre de RD114 y BaEV se intercambió por el de la glicoproteína MLV-A dando como resultado las glicoproteínas quiméricas RD114/TR y BaEV/TR, respectivamente. El péptido R de la cola citoplásmica de la glicoproteína de tipo silvestre BaEV se eliminó, dando como resultado una glicoproteína mutante BaEVRless.
- 10 La **Figura 2** muestra histogramas que representan los títulos de las diferentes partículas de vector lentiviral pseudotipados (VSV-G (1), RD114/TR (2), BaEVwt (3), BaEV/TR (4) y BaEVRless (5) pseudotipado) que codifican el gen marcador de GFP obtenido por infección de células HEK293T con diluciones seriadas de preparaciones de vector concentradas. El porcentaje de células GFP⁺ se determinó por citometría 3 días después de la infección. Los títulos infecciosos se calcularon como unidades infecciosas de GFP (UI)/ml. Se muestran los promedios (n = 7)
- 15 excepto para BaEVwt (n = 3).
- La **Figura 3** muestra histogramas que representan el porcentaje relativo de transducción de células HEK293T por partículas de vector lentiviral pseudotipado con VSV-G (1), RD114/TR (2), BaEV/TR (3) o BaEVRless (4) que se incubaron a 37 °C durante 1 hora en suero humano inactivado por calor (barras de color blanco, el suero se inactivó por calor a 56 °C antes de la incubación con los vectores para inactivar el complemento donde el suero fresco
- 20 contiene complemento activo) o en sueros humanos nuevos (barras de color negro) con respecto a la transducción de los mismos viriones incubados en FCS. Se muestran los valores de las incubaciones de vectores con sueros de 3 donantes diferentes (A, B y C).
- La **Figura 4** muestra los histogramas que representan el porcentaje de transducción de células CD34⁺ humanas no estimuladas (barras de color blanco), pre-estimuladas con SCF (barras con líneas discontinuas), pre-estimuladas con TPO (barras sombreadas en vertical), pre-estimuladas con SCF+TPO (barras sombreadas en horizontal) o pre-estimuladas con SCF+TPO+Flt3-L (barras de color negro) por partículas de vector lentiviral pseudotipado con VSV-G (1), RD114/TR (2), BaEV/TR (3) o BaEVRless (4) a MOI de 10. El análisis para las células que expresan GFP se realizó 6 días después de la transducción.
- La **Figura 5** muestra gráficos que representan el porcentaje de transducción de células CD34⁺ pre-estimuladas con SCF/TPO por partículas de vector lentiviral pseudotipado con VSV-G (x), RD114/TR (●), BaEV/TR (▲) o BaEVRless (■) a MOI de 1, 5, 10, 20 (y 100 para partículas de vector lentiviral pseudotipado con VSV-G). El análisis de las células que expresan GFP se realizó 6 días después de la transducción por FACS.
- La **Figura 6** muestra gráficos que representan el porcentaje de transducción de células CD34⁺ pre-estimuladas con SCF+TPO+Flt3-L por partículas de vector lentiviral pseudotipado con VSV-G (x), RD114/TR (●), BaEV/TR (▲) o BaEVRless (■) a MOI de 1, 5, 10, 20 (y 100 para partículas de vector lentiviral pseudotipado con VSV-G). El análisis de las células que expresan GFP se realizó 6 días después de la transducción por FACS.
- La **Figura 7** muestra histogramas que representan el porcentaje de células formadoras de colonias (CFC) de eritrocitos, granulocíticas y dendríticas que expresan GFP después de la transducción de células CD34⁺ derivadas de sangre de cordón pre-estimuladas con SCF+TPO (barras de color blanco) o pre-estimuladas con SCF+TPO+Flt3-L (barras de color negro) por partículas de vector lentiviral pseudotipado con VSV-G (1), RD114/TR (2), BaEV/TR (3) o BaEVRless (4) a MOI de 100 para VSV-G y 10 para otros pseudotipos. 3 días después de la transducción las células se sembraron en un medio suministrado con citocinas para inducir la diferenciación mieloide. El día 14 de eritrocitos de cultivo, las células formadoras de colonias (CFC) de eritrocitos, granulocitos y dendríticas se puntuaron para determinar la expresión de GFP mediante microscopía de fluorescencia después de la siembra.
- La **Figura 8** muestra histogramas que representan el porcentaje de células formadoras de colonias (CFC) de eritrocitos, granulocitos y dendríticas que expresan GFP (barras de color negro) y de células CD34⁺ que expresan GFP (barras de color blanco) después de la transducción de células CD34⁺ derivadas de sangre de cordón pre-estimuladas con SCF+TPO por partículas de vector lentiviral pseudotipado con VSV-G (1), RD114/TR (2), BaEV/TR (3) o BaEVRless (4) a MOI de 100 para VSV-G y 10 para otros pseudotipos. 3 días después de la transducción las células se sembraron en un medio suministrado con citocinas para inducir la diferenciación mieloide. El porcentaje de células GFP⁺ CD34⁺ se determinó mediante el análisis FACS 6 días después de la transducción. El porcentaje de células CFC GFP se determinó mediante el análisis FACS 17 días después de la transducción. El asterisco indica que la proporción de células GFP⁺ CD34⁺ difiere estadísticamente de la proporción de células transducidas por las colonias GFP⁺ (prueba T de Student: *: p < 0,05, NS: no significativo).
- La **Figura 9** muestra histogramas que representan el porcentaje de células CD45⁺ humanas (barras de color blanco), células progenitoras inmaduras CD34⁺ CD19⁻ (barras de color negro), progenitoras B CD34⁺ CD19⁺ (barras de líneas discontinuas), linfocitos B CD20⁺ (barras sombreadas verticales), progenitoras mieloides CD13⁺ (barras sombreadas horizontales), y granulocitos y monocitos CD14⁺ (barras sombreadas en diagonal) en médula ósea que expresa GFP después de la transducción de células CD34⁺ pre-estimuladas con SCF+TPO durante 48 horas con partículas de

vector lentiviral pseudotipado con VSV-G (1), RD114/TR (2), BaEV/TR (3) y BaEVRLess (4) a MOI indicados entre paréntesis. Tras la irradiación de ratones Balbc Rag2^{-/-}; γ c^{-/-} Balbc recién nacidos, se les inyectó por vía intrahepática 2.10⁵ células CD34⁺ humanas transducidas. Después de 12 semanas de reconstitución, los ratones se analizaron para el injerto de células humanas (CD45) en la médula ósea y los porcentajes de transducción (células GFP⁺) de diferentes células hematopoyéticas se analizaron mediante FACS como se indica.

La **Figura 10** muestra histogramas que representan el porcentaje de células humanas CD45⁺ (barras de color blanco), células progenitoras muy inmaduras CD34⁺ CD10⁻ CD19⁻ (barras de color negro), linfocitos pre B/pro B CD34⁺ CD10⁺ CD19⁻ (barras de líneas discontinuas), linfocitos preB CD19⁺ CD20⁻ (barras sombreadas en vertical), linfocitos B inmaduros CD34⁺ CD10⁺ CD19⁺ (barras sombreadas horizontales), linfocitos B maduros CD20⁺ (barras sombreadas en diagonal) y linfocitos T CD3⁺ (barras sombreadas en cruz) en bazo que expresan GFP después de la transducción de células CD34⁺ pre-estimuladas con SCF/TPO durante 48 horas con partículas de vector lentiviral pseudotipado con VSV-G, RD114/TR, BaEV/TR y BaEVRLess a MOI indicados entre paréntesis. Tras la irradiación de ratones Balbc Rag2^{-/-}; γ c^{-/-} Balbc recién nacidos, se les inyectó por vía intrahepática 2.10⁵ células CD34⁺ humanas transducidas. Después de 12 semanas de reconstitución, los ratones se analizaron para el injerto de células humanas (CD45) en el bazo y los porcentajes de transducción (células GFP⁺) de diferentes células hematopoyéticas se analizaron mediante FACS como se indica.

La **Figura 11** muestra histogramas que representan el porcentaje relativo de transducción de células CD34⁺ de médula ósea de macacos por partículas de vector SIV pseudotipado con VSV-G (1), RD114/TR (2), BaEV/TR (3) o BaEVRLess (4) que se incubaron a 37 °C durante 1 hora en suero de macaco inactivado por calor (barras de color blanco, el suero se inactivó por calor a 56 °C antes de la incubación con los vectores para inactivar el complemento donde el suero fresco contiene complemento activo) o en sueros de macaco nuevos (barras de color negro) con respecto a la transducción de los mismos viriones incubados en FCS. Se muestran los valores de las incubaciones de vectores con sueros de 2 macacos diferentes (A y B).

La **Figura 12** muestra histogramas que representan el porcentaje de células CD34⁺ de médula ósea de macaco cynomolgus pre-estimuladas con SCF+Flt3-L+IL-3+IL-6 que expresan GFP después de la transducción, en presencia de retronectina, por partículas de vector SIV pseudotipado con VSV-G (1), BaEV/TR (2) o BaEVRLess (3) a MOI indicado entre paréntesis.

La **Figura 13** muestra histogramas que representan el porcentaje de células CD34⁺ de médula ósea de macaco rhesus pre-estimuladas con SCF+Flt3-L+IL-3+IL-6 que expresan GFP después de la transducción, en presencia de retronectina, por partículas de vector SIV pseudotipado con VSV-G (1), BaEV/TR (2) o BaEVRLess (3) a MOI indicado entre paréntesis.

La **Figura 14** muestra histogramas que representan el porcentaje de linfocitos T pre-estimulados con IL-7 que expresan GFP después de la transducción, en presencia de retronectina (barras de color negro) o no (barras de color blanco), por partículas de vector lentiviral pseudotipado con VSV-G (1), RD114/TR (2), BaEV/TR (3) o BaEVRLess (4) a MOI de 10.

La **Figura 15** muestra histogramas que representan el porcentaje de linfocitos T de memoria pre-estimulados con IL-7 (barras de color blanco) y linfocitos T sin tratar (barras de color negro) que expresan GFP después de la transducción por partículas de vector lentiviral pseudotipado con VSV-G (1), RD114/TR (2), BaEV/TR (3) o BaEVRLess (4) a MOI indicados entre paréntesis.

La **Figura 16** muestra histogramas que representan el porcentaje de linfocitos T pre-estimulados con TCR que expresan GFP después de la transducción, en presencia de retronectina (barras de color negro) o no (barras de color blanco), por partículas de vector lentiviral pseudotipado con VSV-G (1), RD114/TR (2), BaEV/TR (3) o BaEVRLess (4) a MOI de 10.

La **Figura 17** muestra histogramas que representan el porcentaje de linfocitos B en reposo que expresan GFP después de la transducción, en presencia de retronectina (barras de color negro) o no (barras de color blanco), por partículas de vector lentiviral pseudotipado con VSV-G (1), RD114/TR (2), BaEV/TR (3) o BaEVRLess (4) a MOI indicados entre paréntesis.

La **Figura 18** muestra histogramas que representan el porcentaje de linfocitos B en reposo de memoria (barras de color blanco) y linfocitos B en reposo sin tratar (barras de color negro) que expresan GFP después de la transducción por partículas de vector lentiviral pseudotipado con VSV-G (1), RD114/TR (2), BaEV/TR (3) o BaEVRLess (4) a MOI indicados entre paréntesis.

La **Figura 19** muestra histogramas que representan el porcentaje de linfocitos B en reposo de memoria pre-estimulados con BCR (barras de color blanco) y linfocitos B en reposo sin tratar (barras de color negro) que expresan GFP después de la transducción por partículas de vector lentiviral pseudotipado con VSV-G (1), RD114/TR (2), BaEV/TR (3) o BaEVRLess (4) a MOI indicados entre paréntesis.

La **Figura 20** muestra histogramas que representan el porcentaje de linfocitos B MZL que expresan GFP después de la transducción, en presencia de retronectina (barras de color negro) o no (barras de color blanco), por partículas de vector lentiviral pseudotipado con VSV-G (1), RD114/TR (2), BaEV/TR (3) o BaEVRLess (4) a MOI indicados entre paréntesis.

La **Figura 21A** muestra gráficos que representan el porcentaje de células GFP⁺ hCD45⁺ detectadas por FACS después de los 1^{os} y 2^{os} injertos de ratones. Las células hCD34⁺ de sangre de cordón fueron pre-estimuladas con un cóctel de citocinas (TPO+SCF+Flk-3L) durante 16 h y se transdujeron con BaEV/TR-LV y BaEVRLess-LV a un MOI = 10 durante 36 h. Posteriormente, las células (2 x 10⁵) se inyectaron en el hígado de ratones NOD/SCID y c^{-/-} recién nacidos irradiados (ratones NSG). Tras la reconstitución durante 8-9 semanas, se analizaron los diferentes tejidos hematopoyéticos (médula ósea, bazo y timo) de estos injertos de ratones primarios (1^o) para el injerto de células humanas mediante tinción anti-hCD45. El porcentaje de células GFP⁺ hCD45⁺ detectadas por FACS se indica para cada tipo de vector y cada tejido hematopoyético. Posteriormente, las células hCD34⁺ se aislaron de la médula ósea de cada uno de estos ratones injertados primarios, y se inyectaron 1-2 x 10⁵ células hCD34⁺ aisladas en uno o dos ratones siguiendo el mismo procedimiento que para los injertos primarios. 8-9 semanas tras el injerto, se analizaron estos ratones injertados secundarios (2^o) para el injerto de células humanas transducidas (hCD45⁺ GFP⁺) en la médula ósea, el bazo y el timo. Los injertos secundarios primarios y correspondientes están indicados por el mismo símbolo. La **Figura 21 B** muestra gráficas que representan la detección de linfocitos B humanos GFP⁺ (CD19⁺), células progenitoras inmaduras humanas (CD34⁺) y células progenitoras mieloides (CD13⁺) por FACS en una muestra de médula ósea de ratones NSG receptores secundarios representativos para transducción de BaEV/TR-LV.

La **Figura 22A** muestra la presentación esquemática de la diferenciación de timocitos. HSC, células madre hematopoyéticas; DN, doble negativo; ISP, células CD4 monocatenarias inmaduras; DP, doble positivo; SP4, CD4⁺ positivas simples; SP8, CD8⁺ positivas simples; TCR, receptor de linfocitos T. La **Figura 22B** muestra histogramas que representan el porcentaje de timocitos recién aislados que expresan GFP después de la transducción en presencia de IL-7 (20 ng/ml) con VSV-G⁻, RD114/TR⁻, BaEV/TR⁻ y BaEVRLess-LV que codifican el indicador de GFP en un MOI de 10. Tras la tinción múltiple para CD3, CD4 y CD8, la transducción en las diferentes subpoblaciones de timocitos se determinaron por FACS. La **Figura 22C** muestra histogramas que representan la distribución de las diferentes subpoblaciones de timocitos tras la incubación de los timocitos totales con los diferentes vectores en comparación con los timocitos no transducidos.

La **Figura 23A** muestra histogramas que representan el porcentaje de linfocitos T CB totales recién aislados que expresan GFP después de la pre-estimulación con IL-7 durante 48 h y la transducción posterior con los diferentes vectores: Los VSV-G⁻, RD114/TR⁻, BaEV/TR⁻ y BaEVRLess-LV que codificaron el indicador de GFP en un MOI de 10 o 20, o VSV-G-LV a un MOI de 50. El día 3 de la transducción las células se tiñeron para el marcador de superficie humana: CD45RA, CD62L, CD31 y las eficiencias de transducción en los emigrantes de timocitos recientes (RA⁺/62L⁺/31⁺) y los linfocitos T CB sin tratar más maduros (RA⁺/62L⁺/31⁻) se determinaron por análisis FACS. La **Figura 23B** muestra histogramas que representan la distribución de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T CB sin tratar tras la incubación de linfocitos T CB con los diferentes vectores en comparación con linfocitos T no transducidos.

EJEMPLO

[0106] El siguiente ejemplo demuestra las propiedades ventajosas de las partículas de vectores lentivirales pseudotipados con BaEV/TR y BaEVRLess para su uso como vehículo de transferencia de genes en comparación con vectores lentivirales pseudotipados anteriores.

Materiales y métodos

Producción de vectores lentivirales y titulación

[0107] Se generaron vectores derivados de VIH-1 auto-inactivadores mediante transfección transitoria de células HEK 293T, una línea de células de riñón de embrión humano (Colección Americana de Cultivos Tipo, Rockville, MD, CRL-1573). Se sembraron células 2,6 10⁶ HEK 293T en placas de cultivo de tejido de 10 cm² 24 h antes de la transfección. Se cultivaron células 293T en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Invitrogen) complementado con suero fetal de ternero (FCS) al 10 %. Las células se transfectaron mediante precipitación con Ca-fosfato con 8,6 µg de la construcción de encapsidación Gag-Pol 8.91 y el vector de transferencia SIN derivado de VIH-1 que codifica GFP pHIV-SFFV-GFP-SIN y 2,5 µg de pMD.G, codificando la glicoproteína VSV-G (GP), o 7 µg de pHCMV-RD114/TR, pHCMV-BaEVWT, pHCMV-BaEV/TR o pHCMV-BaEVRLess. A las 16 h después de la transfección, el medio DMEM se reemplazó por medio libre de suero (Opti-MEM, Invitrogen) y 36 h después de la transfección, se recogieron los vectores, se filtraron a través de una membrana de tamaño de poro de 0,45 µm y se concentraron usando un sistema de concentración de ultrafiltración (Vivaspin, Satorius, 2 h a 3000 g (4 °C)) o por concentración a baja velocidad por centrifugación del sobrenadante viral a 3000 g a 4 °C durante la noche o por ultracentrifugación (4 °C, 25000 rpm, 2 h). Posteriormente, los vectores se almacenaron a -80 °C. Para determinar la eficacia de transducción y los títulos infecciosos de vectores de VIH, se añadieron diluciones de preparaciones de

vector a células 293T y se determinó el porcentaje de células GFP⁺ por citometría de flujo 3 días después de la transducción. Los títulos infecciosos se expresan como partículas de vector infeccioso por mililitro (unidad infecciosa IU/ml). Se determinaron multiplicidades de infección (MOI) en las células 293T proliferantes y se indican en todos los experimentos de transducción.

5

Estabilidad de vectores pseudotipados en suero humano o de macaco.

[0108] Se mezclaron partículas infecciosas pseudotipadas de VIH o vector SIV (150000 unidades infecciosas de GFP en 50 µl de tampón en suspensión) con 50 µl de sueros humanos inactivados por calor o recientes. Como referencia, los viriones se incubaron a 37 °C durante 1 h y luego se usaron para transducir células diana HEK293T. Se calculó el porcentaje relativo de transducción de viriones incubados con suero humano a la transducción de los mismos viriones incubados en FCS.

Recolección de muestras y aislamiento de células CD34⁺ humanas

15

[0109] Las muestras de sangre de cordón umbilical (CB) de embarazos a término se recogieron en tubos estériles que contenían anticoagulante (SIGMA) después del consentimiento informado de acuerdo con la declaración de Helsinki. Las células PBMC de baja densidad se separaron por centrifugación sobre un cojín Lymphoprep (Axis shield). Se purificaron células madre/progenitoras CD34⁺ de la fracción de células mononucleares con un kit de aislamiento magnético CD34 (Miltenyi MACS, Miltenyi Biotec) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La pureza de la fracción CD34⁺ seleccionada se evaluó mediante análisis FACS con un anticuerpo anti-CD34 conjugado con APC (BD Pharmingen) y se superó el 95 % para todos los experimentos. Posteriormente, las células CD34⁺ se congelaron en FCS (suero fetal de ternero, Lonza), DMSO al 10 % y se almacenaron a -80 °C.

Aislamiento de linfocitos T y linfocitos B y transducción lentiviral

[0110] Las muestras de sangre periférica de adultos, obtenidas de donantes adultos sanos después del consentimiento informado, se recogieron en tubos que contenían ácido de dextrosa de citrato de ácido (ACD). Los linfocitos T CD3⁺ y los linfocitos B CD19⁺ se purificaron mediante selección negativa usando el sistema complejo tetramérico de Rosette (StemSep Technologies, Vancouver, Canadá). La pureza de los linfocitos B y T aislados se monitorizó utilizando anticuerpos anti-hCD19APC y anti-hCD3APC, respectivamente, y se analizó mediante clasificación celular activada por fluorescencia (FACScalibur, BD). Los linfocitos T y B se cultivaron en medio RPMI 1640 (GibcoBRL Invitrogen, Auckland, Nueva Zelanda) complementado con FCS al 10 % y penicilina/estreptomicina. Los linfocitos T se pre-estimularon con anticuerpos anti-CD3 + anti-CD28 (1 µg/ml) en presencia de hIL-2 (1 ng/ml) o se pre-estimularon durante 3 días con rIL-7 como se describe en Verhoeven et al. (2003) *Blood* 101: 2167-2174 (10 ng/ml; BDBiosciences, Le Pont de Claix, Francia). Los linfocitos B se sembraron inmediatamente para la transducción o se pre-estimularon con *Staphylococcus Aureus* Cowan (SAC, 0,001 %, Calbiochem, San Diego, CA) + IL-2 (1 ng/ml, SIGMA) como se describe en Levy et al. (2010) *Blood* 116: 498-500. En resumen, se sembraron células 1 E5 en placas de 48 pocillos y el vector concentrado se añadió a las dosis indicadas. El porcentaje de células GFP⁺ se determinó mediante FACS 72 h después de la transducción. Los cultivos de linfocitos T transducidos se continuaron en RPMI complementado con rIL-7, se rellenaron cada tres días y se cosecharon para los análisis FACS, qPCR y Alu-PCR. Los linfocitos B se transfirieron a una monocapa de células MS5 en RPMI complementado con suero AB al 10 %, FCS al 5 %, 50 ng/ml de rhSCF, 10 ng/ml de rhIL-15 y 5 ng/ml de rhIL-2 y el medio se renovó cada 4 días.

45

Aislamiento de células CD34⁺ de médula ósea de macaco

[0111] Macacos cynomolgus macho adultos (*Macaca fascicularis*) de 3-4,5 kg fueron importados de Mauricio y alojados en jaulas individuales dentro de instalaciones de animales de bioseguridad de nivel 2 (CEA, Fontenay-aux-Roses), de acuerdo con las directrices nacionales. Todos los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con las directrices europeas para el cuidado de los animales. Los estudios se realizaron bajo protocolos aprobados por el comité regional para la experimentación con animales. Todos los procedimientos y muestras de sangre se realizaron después de que los animales habían sido anestesiados con ketamina 10 mg/kg (Imalgène 1000).

55

[0112] Se obtuvieron células mononucleares de médula ósea del humero y la cresta ilíaca por aspiración y se aislaron mediante centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll estándar. Las células se lavaron dos veces en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se resuspendieron en PBS/FCS al 1 %. La fracción se enriqueció entonces en células CD34⁺ mediante selección inmunomagnética positiva (clon 561, Dynabeads M-450 CD34,

Dynal) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de la inmunolección, la fracción purificada de células CD34⁺ se tiñó usando un anticuerpo monoclonal anti-CD34 (clon 563, BD-Pharmingen). La pureza de las células CD34⁺ seleccionadas varió del 85-95 %.

5 Transducción de HSC humanas y de macaco.

- [0113]** Se incubaron células CD34⁺ humanas y de macaco durante una noche en placas de 24 pocillos en medio libre de suero (CellGro, CellGenix) complementado con antibióticos (PENSTREP, Invitrogen) y con citocinas recombinantes humanas (como se indica): factor de células madre (rSCF, 100 ng/ml), trombopoyetina (TPO, 20 ng/ml) y ligando Flt3 (Flt3-L, 100 ng/ml) (Preprotech) para células CB CD34⁺ humanas. Para las células CD34⁺ de médula ósea de macaco cynomolgus, se añadieron interleucina recombinante humana (IL-6) (20 ng/ml) e interleucina (IL-3) (20 ng/ml) (Preprotech) al cóctel anterior. Se transdujeron 5.10⁴ células CD34⁺ pre-estimuladas en placas de 48 pocillos con sobrenadante de vector lentiviral concentrado a MOI de 1, 5, 10, 20 o 100 (como se indica) en medio libre de suero (CellGro, CellGenix). Cuando se indicó, las transducciones se realizaron en placas recubiertas con retronectina (fragmento de fibronectina humana recombinante CH-296) (Takara). El día 3 después de la transducción, las células se llenaron con citocinas. Después de 3 y 6 días de transducción, el porcentaje de células GFP⁺ se determinó por citometría de flujo.

Ensayo clonogénico de células CD34⁺

- [0114]** Las células CD34⁺ se transdujeron como se ha descrito anteriormente en el presente documento, se lavaron en PBS (Invitrogen) y se pusieron en placas a una densidad de 1000 células/ml en medio de metilcelulosa completo (metilcelulosa al 1 %, FBS al 15 %, BSA al 1 %, insulina pancreática bovina [1 µg/ml], transferrina saturada con hierro [200 mg/ml], 2-mercaptoetanol 10⁻⁴ M, L-glutamina 2 mM, SCF [50 ng/ml], IL-3 [10 ng/ml], IL-6 [10 ng/ml], eritropoyetina [3 U/ml]) (Stem Cell technologies). Las colonias de GFP⁺ se puntuaron mediante microscopía de luz y fluorescencia 14 días después de la siembra.

Análisis por Western blot

- [0115]** Se purificaron LV pseudotipados con BaEVwt, BaEV/TR y BaEVRless sobre un cojín de sacarosa por ultracentrifugación (2 h, 25000 rpm, 4 °C) y se congelaron después de la resuspensión en PBS. La parte superior de la membrana se tiñó con anticuerpos contra el dominio superficial de la glicoproteína BaEV, la parte inferior de la membrana se tiñó con anticuerpos contra la cápside p24 de VIH-1 para evaluar la carga equivalente de vectores purificados. Se indicaron las posiciones de las glicoproteínas mutantes BaEV y la cápside del VIH.

Animales

- [0116]** Se obtuvieron ratones inmunodeficientes BALB/c Rag2^{-/-}, γc^{-/-} del Dr Mamoro Ito, y Taconic (CIEA, Kawasaki, Japón). Todos los ratones utilizados se alojaron en la instalación de animales de la Ecole Normale Supérieure de Lyon, Francia (PBES). Los animales se mantuvieron durante todo el tiempo del experimento en condiciones estériles y todos los experimentos se realizaron de acuerdo con las directrices del cuidado de animales institucionales tras la aprobación de los protocolos por el comité ético local.

Acondicionamiento y reconstitución de ratones Balb-c Rag2^{-/-}, γc^{-/-}

- [0117]** Los ratones BALB/c Rag2^{-/-}, γc^{-/-} recién nacidos de 2 a 4 días de edad se sometieron a irradiación subletal de 2x 1,5Gy. Para la evaluación de la capacidad de reconstitución/diferenciación de células hCB-CD34⁺ transducidas, estas últimas células se transdujeron a un MOI de 10 con BaEV/TR-, BaEVRless-, RD114/TR-, VSV-G-LV y 48 h después de la transducción, se inyectaron 2.10⁵ células por vía intrahepática en ratones recién nacidos. A las 10-12 semanas de injerto de células humanas, se extrajo sangre periférica de la vena facial para comprobar la eficiencia de reconstitución analizando el porcentaje de injerto humano (células hCD45⁺) por FACS.

Análisis FACS

- [0118]** Los ratones se sacrificaron a las 10-12 semanas de injerto de células humanas de acuerdo con los procedimientos bioéticos y se recolectaron todos los tejidos hematopoyéticos. Posteriormente se extrajeron las células de médula ósea, bazo, timo y sangre periférica. Para la detección de la transducción de LV de las células injertadas, el análisis por citometría de flujo se realizó utilizando anticuerpo anti-hCD45 acoplado a APC para la detección del injerto de células humanas totales en la médula ósea. Se usaron anticuerpos acoplados a APC (BD

Pharmingen) para la detección de hCD19 (linfocitos B), hCD34 (células progenitoras tempranas) y hCD13 (progenitoras mieloides).

Resultados

5

La glicoproteína BaEV/TR mutante y la glicoproteína BaEVRLess pueden pseudotipar el vector VIH-1 de manera eficiente

[0119] La glicoproteína quimérica BaEV/TR fue diseñada por los inventores por intercambio de su dominio citoplásmico para la de la glicoproteína MLV-A (**Figura 1**). Se diseñó un segundo mutante mediante la delección del péptido R inhibidor de la fusión del dominio citosólico carboxi-terminal dando como resultado la glicoproteína BaEVRLess (**Figura 1**). Los inventores compararon estas diferentes glicoproteínas de BaEV mutantes en su capacidad para pseudotipar los vectores lentivirales derivados de VIH-1 a glicoproteínas VSV-G y RD114/TR.

[0120] Se generaron vectores de VIH pseudotipados con RD114/TR, BaEV/TR, BaEVRLess y VSV-G mediante transfección transitoria en células HEK293T junto con la encapsidación de gagpol y el vector de VIH que codifica GFP. Los sobrenadantes de vector se concentraron a baja velocidad o ultracentrifugación (100 veces). Los ensayos de infecciones en células HEK293T indicaron que se obtuvieron títulos superiores a 1.10^7 UI/ml para LV pseudotipados con BaEV/TR y BaEVRLess dando como resultado un aumento del título de 40 veces en comparación con BaEVwt-LV. Los vectores pseudotipados con RD114/TR y VSV-G dieron títulos de 6.10^7 UI/ml y 1.10^9 UI/ml (Figura 2). La inmunotransferencia confirmó una menor incorporación de la glicoproteína BaEVwt en la superficie del vector lentiviral en comparación con las glicoproteínas BaEV/TR y BaEVRLess a igual cantidad de la cápside del VIH-1. Estos datos estaban de acuerdo con el aumento en los títulos obtenidos para LV pseudotipados con BaEV/TR y BaEVRLess en comparación con BaEVwt-LV.

25

[0121] Los títulos infecciosos de LV pseudotipados con glicoproteínas mutantes de BaEV (BaEV/TR y BaEVRLess) fueron similares a los de RD114/TR-LV y, por lo tanto, se consideraron además para la transducción de células progenitoras tempranas CD34⁺ humanas y linfocitos T y B.

30 *Estabilidad de los vectores pseudotipados mutantes de BaEV y resistencia a la inactivación del suero humano*

[0122] En vista de la aplicación clínica *in vivo*, los LV pseudotipados mutantes de BaEV deben resistir al sistema del complemento humano. Esta estabilidad se determinó comparando los títulos infecciosos de LV incubados en suero humano 1 hora a 56 °C. Se ha informado que el calor destruye el complemento humano, por lo que se usaron sueros humanos inactivados por calor como control. Los títulos infecciosos residuales obtenidos se informaron a la infectividad de LV incubados con suero fetal de ternero (100 %) (**Figura 3**). Como era de esperar, los LV pseudotipados con VSV-G se inactivaron por los 3 diferentes sueros humanos. Los LV pseudotipados con BaEV/TR y BaEVRLess se mantuvieron estables en presencia de sueros que contenían complemento ya que no se detectó una reducción en la eficiencia de transducción tras la incubación en presencia de complemento humano para los tres donantes diferentes. Por lo tanto, los inventores concluyeron que los LV BaEV/TR y BaEVRLess eran resistentes al sistema de complemento humano en la misma medida que RD114/TR-LV. La estabilidad de LV pseudotipados mutantes de BaEV en suero humano hace que sean mejores candidatos que los pseudotipos de VSV-G LV para aplicaciones *in vivo*.

45 *Los LV pseudotipados con BaEV son muy superiores sobre VSV-G- y RD114/TR-LV para la transducción de células humanas CD34⁺*

[0123] Los LV pseudotipados tanto con BaEV/TR como BaEVRLess se unen a hASCT1 y hASCT2 en la membrana celular de células hCD34⁺ mientras que los RD114/TR LV sólo se unen a hASCT2. Se ha descrito anteriormente que los RD114/TR-LV sólo puede transducir células hCD34⁺ eficientemente en presencia de retronectina. De hecho, la retronectina es un fragmento de fibronectina que se informa que permite la unión de tanto células como vectores y, por lo tanto, aumenta la transducción de células hCD34⁺. Para evaluar el papel de la retronectina en la transducción de LV pseudotipados con BaEV, los inventores inicialmente pre-estimularon células hCD34⁺ con un cóctel de citocinas fuerte (rSCF+rTPO+rFlt3-L) y las transdujeron con LV pseudotipados con VSV-G, RD114/TR, BaEV/TR, BaEVRLess a un MOI de 10 en pocillos recubiertos o no con retronectina. Los inventores observaron que, en presencia de retronectina, ambos BaEV-LV transdujeron las células hCD34⁺ en más del 70 %.

[0124] Como se ha mencionado anteriormente, una estimulación fuerte con un cóctel de citocinas inducirá las HSC a diferenciarse y su pérdida de capacidad de auto-renovación. De hecho, cuanto menos se pre-estimulan las

células, menos se diferencian y más mantienen su carácter de "células madre". Además, cuanto más fuerte sea la estimulación de citocinas, mayor será el riesgo de que se produzcan múltiples integraciones de múltiples vectores por célula a dosis vectoriales altas. Esto podría aumentar el riesgo de genotoxicidad en aplicaciones de terapia génica. Por lo tanto, los inventores probaron si los LV pseudotipados con BaEV podrían transducir eficientemente células hCD34⁺ después de una pre-estimulación de citocinas baja combinada con dosis vectoriales bajas.

[0125] En primer lugar, aplicaron vectores a un MOI fijo (número de partículas infecciosas por células) de 10 y diferentes protocolos de pre-estimulación de citocinas para células hCD34⁺ (**Figura 4**): 1) sin estimulación; 2) estimulación con una única citocina: rSCF o rTPO; 3) rSCF y rTPO; 4) rSCF + rTPO + rFlt3-L. Es importante destacar que la pre-estimulación de citocinas más fuerte utilizada aquí fue menor que los cócteles de estimulación utilizados actualmente en el entorno clínico con el objetivo de limitar la diferenciación celular. Los inventores observaron que una sola estimulación de TPO fue suficiente para una transducción de células hCD34⁺ hasta un 60 % para LV pseudotipados con BaEV, mientras que los VSV-G-LV y RD114/TR-LV transdujeron solamente el 8-20 % de células hCD34⁺ tras la estimulación con TPO. La única pre-estimulación de SCF permitió hasta el 30-50 % de transducción de células hCD34⁺ mientras los VSV-G-LV y RD114/TR-LV sólo alcanzaron niveles de transducción del 10 %. Una combinación de pre-estimulación de TPO+SCF o TPO+SCF+FLK-3 con una única incubación de BaEV-LV dio lugar hasta el 75 % de transducción de células hCD34⁺, mientras que los RD114/TR-LV lograron no más del 40 % de transducción. En conclusión, para los diferentes protocolos de pre-estimulación de citocinas los pseudotipos de BaEV LV superaron a los VSV-G- y RD114/TR-LV en la transducción de células hCD34⁺. Además, los resultados obtenidos en células no estimuladas indicaron que los BaEV/TR LV y BaEVRLess LV fueron capaces de transducir el 10-20 % de las células hCD34⁺ no estimuladas en presencia de retronectina. Por el contrario, los VSV-G- y RD114/TR LV fueron incapaces de transducir células hCD34⁺ inactivas no estimuladas eficientemente a las mismas dosis de vector (MOI = 10).

[0126] En segundo lugar, el riesgo de mutagénesis de inserción debe evitarse para limitar los efectos secundarios de la terapia génica. Por lo tanto, los inventores disminuyeron la dosis del vector con el fin de limitar las integraciones multicopia. Se ensayaron diferentes MOI en estimulaciones rSCF+rTPO y rSCF+rTPO+rFlt3-L (**Figuras 5 y 6**). Los LV pseudotipados con BaEV/TR transdujeron notablemente mejores células hCD34⁺ a dosis vectoriales bajas que alcanzaron el 60 % (rSCF+rTPO) y el 70 % (rSCF+rTPO+rFlt3-L) a un MOI de 5. Los BaEVRLess-LV fueron altamente superiores sobre los RD114/TR-LV a una MOI de 5. Los VSV-G LV, se mantuvieron en dosis vectoriales bajas (MOI 5-10) mucho menos eficientes. Sólo a un MOI de 100 estos VSV-G-LV permitieron una transducción eficiente de células hCD34⁺, una dosis vectorial actualmente utilizada para ensayos clínicos de terapia génica. Sin embargo, la tasa de transducción de VSV-G-LV permaneció muy por debajo de la de BaEV-LV (VSV-G-LV (MOI de 100) = 50-60 % y BaEV-LV (MOI 20) = 75-90 %; **Figuras 5 y 6**). Bajo la condición de estimulación más alta, los inventores observaron que los BaEV/TR-, BaEVRLess-LV y RD114/TR-LV alcanzaron una meseta a un MOI de 10 para BaEV/TR-LV y RD114/TR LV (75 % y 50 % de transducción respectivamente). En consecuencia, la incubación con bajas dosis de vectores BaEV LV inferiores o iguales a 10 fueron suficientes para transducir células hCD34⁺ muy eficientemente y en un grado mucho mayor que RD114/TR-LV y VSV-G LV. En conclusión, los LV pseudotipados con y en particular, BaEV/TR-LV, parecían ser más eficaces para la transducción de células hCD34⁺ que los vectores VSV-G-LV y RD114/TR-LV disponibles actualmente. Claramente, la eficiencia de transducción de células VSV-G-LV hCD34⁺ depende del cóctel de estimulación de citocinas, mientras que para los LV pseudotipados con BaEV no es este el caso.

Las bajas dosis de vectores BaEV-LV permiten transducir a una alta tasa progenitores a corto plazo.

[0127] Los inventores quisieron confirmar que la alta transducción de células hCD34⁺ obtenida con los pseudotipos de BaEV se debió a transducción estable de progenitores a corto plazo. Por lo tanto, se determinó la eficiencia de transducción de los LV pseudotipados con BaEV en progenitores hematopoyéticos gracias a un ensayo clonogénico realizado en un medio de metilcelulosa semi-sólido. Las células pre-estimuladas con rSCF+rTPO y rSCF+rTPO+rFlt3-L se transdujeron con vectores pseudotipados con RD114/TR, BaEV/TR, BaEVRLess a un MOI de 10 y VSV-G a un MOI de 100. Los inventores eligieron un MOI más alto para VSV-G debido a que los ensayos clínicos actualmente trabajan con un MOI de 100 para este pseudotipo para transducir células hCD34⁺. Por lo tanto, pareció más relevante utilizar esta alta dosis de vector para la comparación. Tres días después de la transducción, las células se cultivaron en un medio de metilcelulosa (complementado con citocinas) que permitió su diferenciación en colonias mieloides. Los inventores observaron después de 14 días colonias eritroblásticas, granulomonocíticas y mixtas que expresaban GFP⁺ o no. Primero, compararon el número de colonias que expresaban GFP para diferentes pre-estimulaciones (**Figura 7**). Para todos los vectores ensayados, ambas estimulaciones dieron resultados similares. La proporción de progenitores clonogénicos transducidos con ambos vectores pseudotipados mutantes de BaEV a un MOI de 10 fue mayor que con VSV-G a un MOI de 100 (BaEV/TR-LV = 50-70 %,

BaEVRLess-LV = 45-70 %, VSV-G-LV = 25-50 %). A la misma dosis de vector utilizada para los LV pseudotipados con BaEV/TR y BaEVRLess, sólo el 10-35 % de progenitores clonogénicos fueron transducidos con pseudotipos de RD114/TR LV. No hubo diferencias significativas entre la proporción de células CD34⁺ transducidas por RD114/TR-, BaEV/TR-, BaEVRLess LV después de una pre-estimulación con rCOF + rTPO y los progenitores clonogénicos derivados de ellas lo que indicaba que la transducción de células hCD34⁺ fue estable (Figura 8). Por el contrario, para los VSV-G LV, la proporción de progenitores clonogénicos transducidos fue significativamente menor que la tasa de células CD34⁺ transducidas de las que se obtuvieron (**Figura 8**), lo que sugería que los vectores pseudotipados con VSV-G transdujeron más células CD34⁺ diferenciadas o eran más tóxicas que otros vectores ensayados.

[0128] Estos resultados mostraron que los pseudotipos de BaEV/TR y BaEVRLess-LV se transducen de forma estable a una alta tasa células progenitoras de repoblación a corto plazo.

Los LV pseudotipados con BaEV transducen a una alta eficiencia progenitores hematopoyéticos de repoblación en ratones inmunodeficientes

[0129] Para determinar la eficacia de transducción de ambos vectores pseudotipados mutantes de BaEV en progenitores hematopoyéticos de repoblación, se preestimularon durante 16 h células CD34⁺ de sangre de cordón con rSCF, rTPO y FLk-3L y luego se transdujeron con vectores pseudotipados con RD114/TR, BaEV/TR y BaEVRLess a un MOI de 10 o con LV pseudotipados con VSV-G a un MOI de 100 y se trasplantaron en ratones recién nacidos irradiados subletalmente inmunodeficientes Balbc, Rag2^{-/-}, γ c^{-/-} o ratones NOD/SCID/ γ c^{-/-} (NSG) (Tabla 1). Ambos modelos de ratones permiten el injerto de un sistema completo de sangre humana ya que carecen de linfocitos T, B y células NK.

[0130] Después de 8-10 semanas, los animales se sacrificaron y el porcentaje de células nucleadas de sangre humana total (CD45⁺) en la médula ósea se determinó mediante análisis FACS (Tabla 1).

Tabla 1. Los BaEV/TR- y BaEVRLess-LV permiten una transducción eficiente de células de repoblación de SCID

		Médula ósea					Bazo	Timo
Pseudotipo	Injerto de médula ósea (%)	CD45+ GFP+ (%)	CD34+ GFP+ (%)	CD19+ GFP+ (%)	CD13+ GFP+ (%)	CD14+ GFP+ (%)	CD45+ GFP+ (%)	CD45+ GFP+ (%)
VSV-G								
1(*)	22,1	32,0	18,3	41,0	5,7	7,7	NA	NA
2(*)	2,2	6,8	27,7	15,5	9,6	4,0	NA	NA
3(*)	57,3	5,7	17,7	12,5	22,3	19,2	NA	NA
RD114/TR								
1(*)	32	3,2	2,9	2,8	4	7	NA	NA
2(*)	15,3	39,0	33,8	38,6	34,2	35,0	NA	NA
3(*)	2,3	17,6	16,5	21,8	11,3	13,5	NA	NA
4(*)	34,0	27,2	40,1	27,1	24,1	18,7	NA	NA
5(°)	30,6	76,5	64,5	78,8	57,4	45,2	37,0	41,2
6(°)	25,3	12,6	13,8	10,0	11,1	4,8	20,5	15,8
BaEV/TR								
1(*)	23,6	36,0	41,4	39,1	37,4	56,6	NA	NA
2(*)	21,6	69,7	78,9	68,0	73,7	68,7	NA	NA
3(°)	27,6	92,0	91,7	89,7	82,5	72,7	84,2	84,3
4(°)	36,4	59,3	40,0	59,8	68,0	33,3	69,4	65,5
BaEVRLess								
1(*)	23,8	33,9	35,7	38,7	35,6	38,6	NA	NA
2(*)	10,0	56,2	70,2	66,1	59,3	65,5	NA	NA
4(*)	17,6	70,5	64,4	76,2	67,9	67,6	NA	NA
5(°)	64,1	55,5	51,5	56,0	56,9	59,4	52,0	76,9
6(°)	52,8	52,8	56,0	46,6	61,1	60,0	42,5	4,1
7(°)	89,5	87,5	83,8	86,7	83,1	83,9	69,4	74,8

(*) Ratones Balbc, Rag2-/-, yc-/-
(°) Ratones NOD/SCID/yc-/-

(*) Ratones Balbc, Rag2^{-/-}, γ c^{-/-}

(°) Ratones NOD/SCID/ γ c^{-/-}

[0131] Se detectó un alto nivel comparable de injerto con células humanas para todas las condiciones de

transducción (hasta el 89 %, Tabla 1). Sin embargo, los VSV-G-LV globales permitieron una transducción mucho más baja de las células de repoblación scid en comparación con los otros vectores. Para los VSV-G-LV, los inventores detectaron un 32 % de células hCD45⁺ transducidas en la médula ósea total de los ratones 1 (Tabla 1). En la médula ósea, para LV pseudotipado con VSV-G utilizado a un MOI de 100, observaron un sesgo de transducción ya que la mayoría de linfocitos pre-B y pro B (células CD19⁺ CD34⁺) mostró un 33 % de la transducción, pero los progenitores tempranos (CD34⁺ CD19⁻) y progenitores mieloides (CD13⁺) y monocitos (CD14⁺) mostraron sólo del 5 al 8 % de transducción como máximo (**Figura 9**).

[0132] Por el contrario, para los BaEV/TR y BaEVRLess-LV, el fenotipado detallado mostró que células progenitoras muy tempranas (CD34⁺ CD19⁻), así como progenitores CD19⁺ de linfocitos B y células CD13⁺ progenitoras mieloides se transdujeron en la misma medida ya que se detectó más del 30 % de transducción para todos estos diferentes linajes celulares (**Figura 9**). La Tabla 1 muestra que las células hCD34⁺ transducidas por BaEV/TR-LV y BaEVRLess-LV dio lugar a altos niveles de reconstitución en la médula ósea y los niveles de transducción más altos de células de repoblación de SCID (hasta el 90 % de células CD45⁺ GFP⁺) en la médula ósea. Además, estos altos niveles de transducción se mantuvieron en los ratones receptores primarios en todos los tejidos hematopoyéticos (médula ósea, timo y bazo, Tabla 1). Se detectó una transducción equivalente de alto nivel para progenitores inmaduros (células hCD34⁺), células linfoides (CD19⁺) y células mieloides (CD13⁺ y CD14⁺) en la médula ósea (Tabla 1).

[0133] Para los RD114/TR-LV se detectó menos del 5 % de transducción en todos los diferentes linajes celulares de médula ósea para ratones NR1. Se encontró una imagen idéntica para los progenitores, linfocitos T y B y monocitos en el bazo (**Figura 10**). Los RD114/TR-LV demostraron niveles de transducción variable de células de repoblación de SCID (que varían de 3,2-76 % de células GFP⁺ CD45⁺, Tabla 1).

[0134] En general, estos datos sugerían fuertemente que los BaEV/TR- y BaEVRLess-LV permitieron la transducción de células repobladoras progenitoras muy tempranas, denominadas hHSC, capaces de diferenciarse en todos los diferentes linajes en ratones inmunodeficientes. Por el contrario, los pseudotipos de VSV-G LV no dieron como resultado una transducción equivalente de los diferentes linajes hematopoyéticos lo que indicaba que los VSV-G-LV transdujeron progenitores más diferenciados y HSC menos verdaderas en comparación con los BaEV/TR y BaEVRLess-LV.

[0135] Para confirmar que las HSC verdaderas estaban modificadas genéticamente, se realizaron reconstituciones secundarias de ratones NSG con células hCD34 de médula ósea de ratones NSG primarios previamente reconstituidos con células hCD34⁺ transducidas por BaEV/TR y BaEVRLess-LV durante al menos 2 meses.

[0136] Para mejorar el injerto en receptores secundarios, las células hCD34⁺ derivadas de médula ósea de NSG primarias se cultivaron en SCF y TPO para aumentar, o al menos mantener, la capacidad de localización de estas células. Después de 16-18 h de pre-estimulación, se inyectaron 1-2 x 10⁵ células hCD34⁺ en el hígado de ratones NSG recién nacidos sometidos a irradiación sub-letal. A las 8-9 semanas después del trasplante, se analizó la médula ósea, el bazo y el timo de los ratones receptores secundarios para determinar el porcentaje de células CD45⁺ GFP⁺ humanas (**Figura 21A**). En el bazo y la médula ósea el porcentaje de células GFP⁺ hCD45⁺ se mantuvo o aumentó en los ratones receptores secundarios (**Figura 21A**). Además, tanto para los BaEV/TR los como BaEVRLess-LV, se detectaron altos niveles de células GFP⁺ hCD34⁺, células linfoides (CD19⁺) y mieloides (CD13⁺) en la médula ósea de estos ratones receptores secundarios y se detectaron porcentajes equivalentes de células GFP⁺ en estos diferentes linajes (**Figura 21B**). Esto indicaba que las células de repoblación de SCID reconstituyentes secundarias eran capaces de diferenciarse por multi-linaje y que las HSC humanas verdaderas se modificaron genéticamente a niveles elevados por los BaEV/TR- y BaEVRLess-LV.

Los vectores SIV pseudotipados con BaEV/TR y BaEVRLess transducen eficientemente células de médula ósea CD34⁺ de macaco rhesus y cynomolgus.

[0137] Los vectores lentivirales basados en el VIH transducen muy eficientemente las células hCD34⁺, mientras que transducen muy mal las células correspondientes de monos del viejo mundo (babuinos, macacos rhesus y cynomolgus). Esto se atribuye a los factores de restricción (TRIM5a) que interfieren en varias etapas posteriores a la entrada del VIH en células simiescas. Por lo tanto, dado que el macaco cynomolgus es un modelo animal importante, los inventores cambiaron a un sistema de LV basado en SIV (virus de la inmunodeficiencia del simio), previamente desarrollado por los inventores (Negre et al. (2000) Gene Ther. 7: 1613-1623), no fue sometido a estas restricciones post-entrada y permitió la transducción eficiente de linfocitos T de macado y células CD34⁺. Para

todos los pseudotipos, obtuvieron títulos infecciosos similares para pseudotipos derivados de SIV en comparación con vectores de VIH.

[0138] Se evaluó la estabilidad de los vectores pseudotipados en sueros de macaco cynomolgus. Se mezclaron las mismas cantidades de partículas infecciosas pseudotipadas con sueros de macaco frescos y con sueros de macaco incubados durante 1 h a 56 °C lo que permitió inactivar el sistema del complemento. En contraste con VSV-G LV que fueron fácilmente inactivados en sueros frescos, los pseudotipos de RD114/TR-, BaEV/TR- y BaEVRLess-LV se mantuvieron estables tras la incubación con sueros de macaco evaluados (**Figura 11**). Esto se confirmó por dos donantes de macaco independientes.

[0139] Con el fin de evaluar la transducción de células CD34⁺ de macaco, los inventores pre-estimularon células CD34⁺ de macaco cynomolgus derivadas de la médula ósea con un cóctel fuerte de citocinas (rSCF+rTPO+rFlt3-L+rIL-3+rIL-6) durante 16 h. Se transdujeron con SIV-LV pseudotipados con VSV-G, RD114/TR, BaEV/TR, BaEVRLess a un MOI de 10 o 20 en pocillos de cultivo recubiertos con retronectina (**Figura 12**). Como se indicó para los pseudotipos de VSV-G-LV, observaron que permiten la una transducción de bajo nivel de las células CD34⁺ de macaco independientemente de la presencia de retronectina. Es importante destacar que, los pseudotipos de RD114/TR, BaEV/TR y BaEVRLess LV necesitaban retronectina para transducir células CD34⁺ de macaco. Los SIV-LV pseudotipados con BaEV/TR a un MOI de 20 transdujeron hasta el 60 % de células CD34⁺ células de macaco cynomolgus mientras que los BaEVRLess LV mostró hasta el 45 % de la transducción (**Figura 12**). La transducción de las células CD34⁺ del macaco rhesus fue ligeramente diferente ya que los BaEV/TR-LV permitieron los niveles de transducción más altos (50 %) y fueron superiores sobre los VSV-G- y BaEVRLess-LV en eficiencia (**Figura 13**).

[0140] Estos primeros resultados indicaron que los pseudotipos de BaEV/TR y BaEVRLess-LV transducían eficientemente las células CD34⁺ de macaco cynomolgus y rhesus, lo que significa que es posible evaluar estos vectores para pruebas preclínicas de vectores de terapia génica en estos modelos de primates, que son biológicamente muy cercanos a los seres humanos.

Los BaEV/TR- y BaEVRLess-LV permiten una transducción eficiente de linfocitos T humanos estimulados por el receptor rIL-7 y de linfocitos T

[0141] Otra diana esencial para la terapia génica son los linfocitos T. Los linfocitos T sin tratar son "las" dianas de terapia génica de interés, ya que estas son las células de larga vida que al corregirse podrían persistir durante años. Los BaEV/TR- y BaEVRLess-LV permitieron una transducción eficiente de linfocitos T humanos pre-estimulados con rIL-7 y fueron superiores sobre VSV-G-LV para las mismas dosis de vector (MOI = 10) en presencia de retronectina (% de transducción, BaEV/TR-LV = 25-43 %, BaEVRLess = 25-45 %, VSV-G-LV = 5-15 %, **Figura 14**). Sorprendentemente, los RD114/TR-LV permitieron una eficiencia de transducción mucho menor de linfocitos T pre-estimulados con rIL-7 en comparación con los BaEV-LV (RD114/TR-LV = 5-15 %). Además, los BaEV/TR y BaEVRLess-LV permitieron un nivel de transducción eficiente alto tanto de los linfocitos T pre-estimulados con IL-7 tanto sin tratar como de memoria (**Figura 15**). Dado que rIL-7 es una citocina de supervivencia de linfocitos T que regula la homeostasis de los linfocitos T, no se induce un cambio fenotípico sin tratar a de memoria en comparación con una estimulación de un receptor de linfocitos T (TCR) que indujo un cambio de fenotipo de linfocito T sin tratar a de memoria. De hecho, los BaEV/TR- y BaEVRLess-LV permitieron la transducción de linfocitos T estimulados con IL-7 sin comprometer su fenotipo nativo. Esto es muy relevante para muchas aplicaciones de terapia génica.

[0142] Hasta la fecha, la mayoría de los ensayos clínicos utilizan linfocitos T estimulados con TCR. Es de gran interés que, los BaEV/TR y BaEVRLess-LV permitieron hasta el 90 % de transferencia génica de linfocitos T en TCR estimulado a dosis vectoriales bajas (MOI = 10) y, por lo tanto, superaron de lejos a los VSV-G- y RD114/TR-LV para transducción de linfocitos T pre-estimulados con TCR (**Figura 16**).

[0143] En general, los nuevos BaEV/TR- y BaEVRLess-LV son herramientas prometedoras de transferencia génica para la terapia génica de linfocitos T.

Los BaEV/TR- y BaEVRLess-LV permiten la transducción eficiente de linfocitos B humanos no estimuladas y estimulados con BCR

[0144] Los linfocitos B son dianas atractivas para la terapia génica de enfermedades genéticas asociadas con la disfunción de linfocitos B. Además, la expresión transgénica de larga duración en linfocitos B es de particular interés para la inmunoterapia por su potencial para inducir una activación o tolerancia inmunitaria específica.

Además, la entrega eficiente de genes o shRNA para la inactivación de la expresión génica en los linfocitos B humanos primarios permitirá estudiar las funciones génicas en estas células. Sin embargo, los linfocitos B primarios permanecen muy poco transducibles con los LV pseudotipados con VSVG incluso al estimarse en la proliferación por reticulación de CD40 en presencia de diversas citocinas.

5

[0145] Dado que los LV pseudotipados con glicoproteína BaEV eran capaces de transducir linfocitos T, los inventores los evaluaron para determinar la transferencia génica a linfocitos B humanos primarios.

[0146] Los VSV-G-LV fueron incapaces de transducir linfocitos B humanas en reposo no estimulados de manera eficiente incluso a dosis vectoriales altas (MOI = 100, VSV-G-LV <5 % de transducción). Es de interés que, los RD114/TR-LV sólo permitieron niveles bajos de transducción de hasta el 8 % de los linfocitos B en reposo primarios (**Figura 17**). Los BaEV/TR-LV y los BaEVRLess-LV permitieron una transducción altamente eficiente del 20-30 % de los linfocitos B en reposo y, por lo tanto, superaron a los VSV-G-LV y los RD114/TR-LV de lejos (**Figura 17**, Retronectina). Tras la estimulación del receptor de linfocitos B (BCR), los BaEV/TR- y BaEVRLess-LV transdujeron hasta el 70 % de los linfocitos B mientras que la eficiencia de transducción de VSV-G-LV no excedió el 5 %. Los RD114/TR-LV permitieron la transducción del 25 % de los linfocitos B primarios estimuladas por BCR. Es de importancia que, los BaEV/TR- y BaEVRLess-LV se transdujeron también como linfocitos B de memoria y sin tratar eficientemente en presencia de retronectina (**Figuras 18 y 19**). Es de interés que, los linfocitos B de linfoma de zona marginal primaria (MZL) se transdujeron eficientemente por BaEV/TR- y BaEVRLess-LV (hasta el 75 %) en presencia de retronectina (**Figura 20**).

[0147] Por lo tanto, los BaEV/TR-LV y los BaEVRLess-LV superaron a los VSV-G-LV y los RD114/TR-LV en la transducción de linfocitos B humanos sanos y de cáncer y podrían ser herramientas prometedoras para genes e inmunoterapia a base de linfocitos B.

25

Los BaEVgp LV permiten una transducción de alto nivel de timocitos en fases tempranas de la diferenciación

[0148] El timo es el sitio primario del desarrollo de linfocitos T y juega un papel clave en la inducción de la auto-tolerancia. Por lo tanto, el direccionamiento del timo con un antígeno de interés puede dar como resultado la inducción de tolerancia. De hecho, esto se ha logrado mediante la inyección directa de antígeno soluble, de un vector viral que alberga un antígeno de interés o incluso de células enteras (Khoury et al. (1993) J Exp Med. 178: 559-66, Marodon et al. (2006) Blood 108: 2972-8, Posselt et al. (1992) Science 256: 1321-4). En segundo lugar, se demostró la corrección *in situ* de una inmunodeficiencia genética, ZAP-70, por inyección intra-timo de un vector lentiviral que expresaba el gen corrector (Adjali et al. (2005) J Clin Invest. 115: 2287-95).

35

[0149] La diferenciación de timocitos es un proceso altamente regulado que se produce a través de la interacción con las células del estroma tímico y la estimulación de citocinas (**Figura 22A**). Las células madre hematopoyéticas (CD34⁺ CD1a⁻) están migrando de la médula ósea al timo donde primero adquieren la expresión de CD1a y carecen de la expresión de los marcadores CD8 y CD4 (fase doble negativa CD8-CD4⁻ (DN); 2-5 % del total timocitos). Estas células DN se desarrollan posteriormente en células positivas individuales CD4 inmaduras (ISP) y ganan expresión del receptor de linfocitos pre-T (pre-TCR, **Figura 22A**). La aparición del marcador de superficie CD8 junto con CD4 y la maduración del TCR se denomina fase de doble positivo (DP) del desarrollo de timocitos (80-90 % de los timocitos totales). Tras la selección en el timo, los timocitos DP se desarrollan en timocitos CD8 + CD4⁻ (SP8) y CD8-CD4⁺ (SP4) (**Figura 22A**).

45

[0150] Debido al valor potencial de la transferencia de genes de timocitos para la modulación inmune, es importante desarrollar vectores para una transducción de timocitos eficiente. Por lo tanto, los inventores evaluaron el rendimiento de los BaEVgp-LV en comparación con los otros pseudotipos de LV para la transducción de todas estas diferentes subpoblaciones de timocitos. Tras el aislamiento de los timocitos de un timo humano, los transdujeron en presencia de la citocina de supervivencia IL-7 con VSV-G-, RD114/TR-, BaEV/TR- y BaEVRLess-LV que codifican el indicador de GFP en un MOI de 10. Para todos los experimentos de transducción se utilizaron placas revestidas con retronectina. Tres días más tarde se determinaron los niveles de transducción por FACS en las diferentes subpoblaciones de timocitos utilizando tinción triple de CD4/CD8/CD3.

[0151] Los VSV-G-LV no permiten la transducción eficiente de todas estas subpoblaciones diferentes que alcanzan entre el 10 y el 20 % de células transducidas (**Figura 22B**). Los RD114/TR-LV, BaEV/TR-LV y BaEVRLess-LV aunque permiten la transducción preferencial de los timocitos en las primeras fases de desarrollo (DN e ISP) mientras que todavía transducen a los más maduros a un nivel inferior (**Figura 22B**). Como ya se detectó para los linfocitos T humanos adultos, los BaEVgp LV transdujeron todas las diferentes subpoblaciones de timocitos

más eficientemente que los RD114/TR-LV. Además, la transducción con los diferentes pseudotipos de vectores lentivirales no tuvo ningún efecto sobre la distribución de diferentes subpoblaciones de timocitos (**Figura 22C**). Esto indica que los BaEVgp-LV son excelentes herramientas para la transducción de timocitos y que son especialmente superiores a VSV-G- y RD114/TR-LV para la transducción de las subpoblaciones de timocitos DN e ISP inmaduros.

5

Los BaEVgp-LV permiten una transducción de alto nivel de emigrantes de timocitos recientes de sangre de cordón

[0152] Puede ser de gran interés para la terapia génica de linfocitos T o la inmunoterapia modificar genéticamente verdaderamente linfocitos T verdaderamente sin tratar, que se entiende que son las células que persisten durante toda la vida de un individuo. Por lo tanto, los inventores se centraron en linfocitos T de sangre de cordón umbilical (CB) ya que están ganando importancia en el contexto de trasplantes alogénicos de CB. La mayoría de los linfocitos T CB están sin tratar y proporcionan la ventaja de que representan un riesgo reducido de enfermedad de injerto contra huésped (GVHD), un efecto secundario común que se observa en el trasplante alogénico de médula ósea, incluyendo los linfocitos T adultos alogénicos. Sin embargo, a diferencia de los linfocitos T adultas, los linfocitos T CB ejercen un efecto reducido de injerto contra leucemia. La mayoría de los linfocitos T CB (70-80 %) se identifican por tinción positiva a CD31, CD62L y CD45RA, que es una población de linfocitos T sin tratar muy inmaduros y se llaman emigrantes timocitos recientes (RTE). La modificación genética de estas células en el contexto del trasplante alogénico para aumentar su efecto de injerto contra leucemia sin aumentar la GVHD será beneficiosa (Micklethwaite et al. (2010) Blood 115: 2695-703). Por lo tanto, los inventores ensayaron varios pseudotipos del vector lentiviral para su eficacia de transducción de RTE CB.

[0153] Para conservar el fenotipo sin tratar de linfocitos T, se pre-estimularon linfocitos T CB totales recién aislados con la citocina de supervivencia de linfocitos T, IL-7, y posteriormente se les transdujo con los diferentes vectores: VSV-G-, RD114/TR-, BaEV/TR- y BaEVRLess-LV que codifican el indicador de GFP a un MOI de 10 o 20, excepto para VSV-G-LV para los que se aplicó una dosis vectorial más alta (MOI de 50). La Figura 23A muestra que los BaEV/TR- y BaEVRLess-LV muestran una eficiencia de transducción altamente superior (transducción al 40-50 %) a un MOI = 10 en comparación con VSV-G o RD114/TR-LV (**Figura 23A**). Es importante destacar que los BaEV/TR- y BaEVRLess-LV alcanzaron fácilmente el 65 % de transducción cuando la dosis vectorial fue 2 veces mayor (MOI = 20; **Figura 23A**). En todos los casos, los emigrantes de timocitos recientes sin tratar (CD69L+ CD45RA+ CD31+) se transdujeron en la misma medida que los linfocitos T CB sin tratar más maduros (CD69L+ CD45RA+ CD31-; **Figura 23A**). Además, la transducción no tuvo ningún efecto sobre la distribución de estas dos poblaciones de linfocitos T CB sin tratar (**Figura 23B**).

Análisis

35

[0154] En este ejemplo, los inventores describieron el pseudotipaje eficiente de vectores lentivirales usando una nueva glicoproteína de envoltura BaEV derivada del virus endógeno de babuino. Dos mutantes de esta glicoproteína: la glicoproteína quimérica BaEV/TR y la glicoproteína BaEVRLess, permitieron una mejor incorporación en la superficie del LV en comparación con la glicoproteína BaEVwt. Los LV pseudotipados por estas envolturas puede producirse a altos títulos (1.10^7 IU/ml). Al igual que los pseudotipos RD114/TR-LV, eran estables en sueros humanos y de macaco, lo que permite perspectivas clínicas potenciales para la administración *in vivo* de transgenes.

[0155] En cuanto a la transducción de células hCD34⁺, los pseudotipos de LV mutante de BaEV fueron superiores a VSV-G y RD114/TR. En primer lugar, fueron capaces de transducir células hCD34⁺ tras protocolos de muy baja pre-estimulación. De hecho, actualmente se usan cócteles de citocinas que contienen rSCF, rTPO, rFlt3-L e IL-3 pero se notificó que cuantas más células hCD34⁺ sean estimuladas, más se diferencian y pierden su capacidad de reconstitución hematopoyética a largo plazo. Además, se pensó que IL-3 aumentaba notablemente la diferenciación de CD34⁺. Aquí, los inventores mostraron que los BaEV/TR- y BaEVRLess-LV alcanzaron altas tasas de transducción de células hCD34⁺ cuando se pre-estimularon con rSCF, rTPO o rSCF y la co-estimulación con rTPO durante un corto tiempo de 16 h. Estos protocolos de estimulación de citocinas suaves redujeron en gran medida el riesgo de diferenciación de HSC presentes en la población de células hCD34⁺. Es de gran importancia que, estos resultados indicaron que los pseudotipos de BaEV/TR-LV pueden transducir el 10-20 % de las células hCD34⁺ no estimuladas mientras que los VSV-G-LV y RD114/TR-LV permanecieron ineficientes. Por lo tanto, puesto que no se necesita estimulación con citocinas para lograr una transducción eficiente de células hCD34⁺ con BaEV/TR o BaEVRLess-LV, posiblemente permiten conservar mejor el carácter de células madre de las células hCD34⁺.

[0156] Otra observación importante fue que a bajos MOI (5 y 10), el vector lentiviral pseudotipado con

BaEV/TR y BaEVRLess respectivamente, transdujo consistentemente células CD34⁺ humanas mejor que los pseudotipos de VSV-G LV a MOI de 100. El uso de un vector lentiviral a un MOI muy bajo podría limitar la mutagénesis de inserción que se produce cuando el ADN proviral se inserta en un oncogén de las células huésped. Si se integran demasiados vectores en el genoma de la célula huésped, esto podría conducir a la genotoxicidad debido a la desregulación del gen de la célula huésped. Por lo tanto, en el caso de los BaEV-LV, sería posible disminuir significativamente las dosis de vectores a niveles seguros sin una pérdida significativa de la tasa de transducción. Por el contrario, para los VSV-G-LV, fueron necesarias dosis de vector muy altas para permitir una transducción de células hCD34⁺ eficiente.

10 **[0157]** La capacidad de los pseudotipos de BaEV/TR- y BaEVRLess-LV de transducir altamente células de repoblación a corto plazo y los resultados sobre la reconstitución de la médula ósea y bazo de ratones inmunodeficientes con células marcadas con genes en todos los diferentes linajes celulares humanos son argumentos que sugieren fuertemente que en realidad transducen HSC.

15 **[0158]** Además, los nuevos BaEV/TR- y BaEVRLess-LV son herramientas de transferencia génica prometedoras para la terapia génica de linfocitos T ya que permiten una alta transducción de linfocitos T pre-estimulados con IL-7 sin inducir un cambio fenotípico. Además, si se considera la necesidad de una corrección de tiempo de vida, es necesario transducir los linfocitos T sin tratar de larga vida que se muestran aquí como altamente susceptibles a la transferencia génica mediada por BaEV/TR- y BaEVRLess-LV y, por lo tanto, pueden conocerse muchas aplicaciones *in vivo*.

[0159] Finalmente estos BaEV/TR y BaEVRLess-LV representan una nueva herramienta que permite una transferencia génica altamente estable de linfocitos B inactivos primarios que ahora hace posible estudiar con facilidad la función génica y la transferencia génica terapéutica en estas células. Estos nuevos vectores pueden permitir la expresión de moléculas coestimuladoras tales como moléculas CD40L o B7 en linfocitos B tumorales no divisorios tales como B-CLL, con el fin de provocar respuestas inmunes contra células modificadas con genes y no modificadas. También permiten la introducción de ADN que codifica las cadenas ligera y pesada de anticuerpos específicos (por ejemplo, anticuerpos dirigidos específicamente contra VIH o VHC) o epítomos en linfocitos B de memoria autólogos con el fin de permitir la inducción de inmunoterapia y tolerancia tras la reinfusión de las células diseñadas.

[0160] La administración génica *in vivo* de vectores lentivirales que muestran BaEV/TR- o BaEVRLess-LV en HSC, linfocitos B o linfocitos T hará que la terapia génica sea mucho más fácil. Las ventajas de la administración *in vivo* de genes son múltiples. La transferencia génica *in vivo* podría dirigirse a todas las HSC en su nicho de la célula madre, lo que crea un microambiente que regula la supervivencia y el mantenimiento de las HSC. Además, para la mayoría de las enfermedades hay un requisito de un número mínimo de células corregidas con genes para ser reinfundidas. Este requisito podría ser un factor limitante al tratar a los niños ya que el aislamiento con CD34⁺ produce una pérdida significativa de esta población diana o en síndromes de fallo de la médula ósea como la anemia de Fanconi, en la que los pacientes ya padecen de forma temprana un número reducido de células hCD34⁺. Todas estas preocupaciones podrían superarse mediante la administración *in vivo* de genes dirigidos a las HSC. Un razonamiento idéntico es posible para los linfocitos T y especialmente para los linfocitos B, ya que estas últimas células entran fácilmente en la apoptosis durante el cultivo *ex vivo*.

[0161] En resumen, los inventores han desarrollado un pseudotipo nuevo y aparentemente eficaz para vectores lentivirales. El LV pseudotipado con BaEV/TR y BaEVRLess probablemente será útil para muchas aplicaciones fundamentales y clínicas, ya que presentan una gran cantidad de ventajas tal como la transducción muy alta de HSC primarias humanas, linfocitos T y linfocitos B.

Tabla de referencia de los identificadores de secuencia:

SEQ ID NO:	Característica
1	Ácido nucleico que codifica la glicoproteína de envoltura de BaEV de tipo silvestre
2	Glicoproteína de envoltura de BaEV de tipo silvestre
3	Dominio de cola citoplasmática de la glicoproteína de BaEV de tipo silvestre
4	Dominio transmembrana de la glicoproteína de BaEV de tipo silvestre
5	Dominio extracelular de la glicoproteína de BaEV de tipo silvestre
6	Péptido R inhibidor de fusión de la glicoproteína de envoltura de BaEV de tipo silvestre
7	Glicoproteína de envoltura de BaEV modificada en la que el dominio de la cola citoplásmica está desprovisto del péptido R inhibidor de la fusión (BaEVRLess)

8	Dominio de cola citoplasmática de la glicoproteína de MLV de tipo silvestre
9	Fusión del dominio transmembrana y extracelular de la glicoproteína de envoltura de BaEV y el dominio de cola citoplásmica de la glicoproteína de envoltura de MLV (BaEV/TR)
10	SCF humano de tipo silvestre
11	TPO humana de tipo silvestre
12	IL-2 humana de tipo silvestre
13	IL-7 humana de tipo silvestre
14	IL-15 humana de tipo silvestre
15	FIt3-L humana de tipo silvestre

LISTA DE SECUENCIAS

[0162]

- 5 <110> Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM)
Ecole Normale Supérieure de Lyon
- <120> Vectores lentivirales pseudotipados con glicoproteínas de BaEV mutantes
- 10 <130> BET12P2372
- <150> EP 11306247.5
- <151> 29-09-2011
- 15 <160> 15
- <170> PatentIn versión 3.4
- 20 <210> 1
<211> 1692
<212> ADN
<213> Virus endógeno del babuino
- 25 <400> 1

atgggattca caacaaagat aatcttctta tacaacctag tactggtcta cgcgggggttt	60
gacgaccctc gcaaagccat agaactagta caaaagcgat atggccgacc atgcgattgc	120
agcggaggac aagtgtcoga gcccccgta gacagggtca gtcaagtgaac ttgctcaggc	180
aagacagctt acttaatgcc cgaccaaaga tggaaatgta agtcaattcc aaaagacacc	240
tccccaagcg ggccactcca agagtgtccc tgtaattctt accagtcctc agtacacagt	300
tcttggtata cctcatacca acaatgcaga tcaggcaata agacatatta tacggctact	360
ctgctaaaaa cacaaactgg gggcaccagt gatgtacaag tattaggatc caccaacaaa	420
cttatacaat ctccctgtaa tggcataaaa gggcagtcta tttgctggag cactacagct	480
cctatccacg tctctgatgg aggaggtcca ttagacacca caagaattaa aagtgttcag	540
agaaaactgg aagaaattca taaagcccta tatcctgaac ttcagtatca ccctttggcc	600
atacctaagg ttagagataa cctcatggtc gatgccaga ctttaaacad tctcaatgcc	660
acttacaact tactcctaata gtccaacacg agcctagtgg acgactgttg gctttgttta	720
aaattaggtc cccctactcc cctcgcaata cctaacttcc tattatccta cgtgactcgc	780
tctcgggata atatctcttg ttttaataatt ccccccttc tagttcaacc gatgcagttt	840
tccaattcat cttgcctctt tccccctcc tacaacagta cagaagaaat agatctaggc	900
catgttgcc ttagcaactg tacctccata accaatgtca ccggtcccat atgcgctgta	960
aatgggtcgg tctttctctg tggcaataac atggcataca cttatctacc cacgaactgg	1020
acggggcttt gcgtcctagc aactctctc cccgacattg acatcattcc cggagatgaa	1080
ccggtcccca tccctgctat tgatcatttt atatatagac ctaaaccgggc catacagttt	1140
attcctttac tagcagggtc agggatcacc gcagccttca caacaggagc tacaggccta	1200
ggtgtctctg tgaccaata tacaaaatta tctaatacgc taatttctga tgtacaaatc	1260
ttatctagca ccatacaaga tctgcaagat caagtagact cattagccga agtggttctc	1320
cagaacagaa gggggctaga tctacttaca gcagaacaag gaggaatctg tttagccctg	1380
caagaaaaat gctgctttta tgtaacaag tcagggtattg tgagagacaa aataaaaacc	1440
ttacaagaag aactagaaag acgtagaaaa gatctagctt ccaaccact ttggactggg	1500
cttcaagggc tctccctta cctcctgcc tttcttggcc ctctacttac cctcctgctc	1560
ttactcacca ttgggcccgtg catttttaac cgtctaaccg cttttattaa tgataagtta	1620
aacataatac acgctatggt gctaacccaa cagtatcagg tgctcagaac cgatgaagaa	1680
gctcaagatt ga	1692

<211> 563
 <212> PRT
 <213> Virus endógeno del babuino

5 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(506)
 <223> dominio extracelular

10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (507)..(529)
 <223> dominio transmembrana

15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (530)..(564)
 <223> cola citoplasmática

20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (547)..(564)
 <223> Péptido R

25 <400> 2

Met	Gly	Phe	Thr	Thr	Lys	Ile	Ile	Phe	Leu	Tyr	Asn	Leu	Val	Leu	Val
1				5					10					15	
Tyr	Ala	Gly	Phe	Asp	Asp	Pro	Arg	Lys	Ala	Ile	Glu	Leu	Val	Gln	Lys
			20					25					30		
Arg	Tyr	Gly	Arg	Pro	Cys	Asp	Cys	Ser	Gly	Gly	Gln	Val	Ser	Glu	Pro
			35				40					45			
Pro	Ser	Asp	Arg	Val	Ser	Gln	Val	Thr	Cys	Ser	Gly	Lys	Thr	Ala	Tyr
	50					55					60				

ES 2 642 276 T3

Leu Met Pro Asp Gln Arg Trp Lys Cys Lys Ser Ile Pro Lys Asp Thr
 65 70 75 80
 Ser Pro Ser Gly Pro Leu Gln Glu Cys Pro Cys Asn Ser Tyr Gln Ser
 85 90 95
 Ser Val His Ser Ser Cys Tyr Thr Ser Tyr Gln Gln Cys Arg Ser Gly
 100 105 110
 Asn Lys Thr Tyr Tyr Thr Ala Thr Leu Leu Lys Thr Gln Thr Gly Gly
 115 120 125
 Thr Ser Asp Val Gln Val Leu Gly Ser Thr Asn Lys Leu Ile Gln Ser
 130 135 140
 Pro Cys Asn Gly Ile Lys Gly Gln Ser Ile Cys Trp Ser Thr Thr Ala
 145 150 155 160
 Pro Ile His Val Ser Asp Gly Gly Gly Pro Leu Asp Thr Thr Arg Ile
 165 170 175
 Lys Ser Val Gln Arg Lys Leu Glu Glu Ile His Lys Ala Leu Tyr Pro
 180 185 190
 Glu Leu Gln Tyr His Pro Leu Ala Ile Pro Lys Val Arg Asp Asn Leu
 195 200 205
 Met Val Asp Ala Gln Thr Leu Asn Ile Leu Asn Ala Thr Tyr Asn Leu
 210 215 220
 Leu Leu Met Ser Asn Thr Ser Leu Val Asp Asp Cys Trp Leu Cys Leu
 225 230 235 240
 Lys Leu Gly Pro Pro Thr Pro Leu Ala Ile Pro Asn Phe Leu Leu Ser
 245 250 255
 Tyr Val Thr Arg Ser Ser Asp Asn Ile Ser Cys Leu Ile Ile Pro Pro
 260 265 270
 Leu Leu Val Gln Pro Met Gln Phe Ser Asn Ser Ser Cys Leu Phe Ser
 275 280 285
 Pro Ser Tyr Asn Ser Thr Glu Glu Ile Asp Leu Gly His Val Ala Phe
 290 295 300
 Ser Asn Cys Thr Ser Ile Thr Asn Val Thr Gly Pro Ile Cys Ala Val
 305 310 315 320

ES 2 642 276 T3

Asn Gly Ser Val Phe Leu Cys Gly Asn Asn Met Ala Tyr Thr Tyr Leu
 325 330 335
 Pro Thr Asn Trp Thr Gly Leu Cys Val Leu Ala Thr Leu Leu Pro Asp
 340 345 350
 Ile Asp Ile Ile Pro Gly Asp Glu Pro Val Pro Ile Pro Ala Ile Asp
 355 360 365
 His Phe Ile Tyr Arg Pro Lys Arg Ala Ile Gln Phe Ile Pro Leu Leu
 370 375 380
 Ala Gly Leu Gly Ile Thr Ala Ala Phe Thr Thr Gly Ala Thr Gly Leu
 385 390 395 400
 Gly Val Ser Val Thr Gln Tyr Thr Lys Leu Ser Asn Gln Leu Ile Ser
 405 410 415
 Asp Val Gln Ile Leu Ser Ser Thr Ile Gln Asp Leu Gln Asp Gln Val
 420 425 430
 Asp Ser Leu Ala Glu Val Val Leu Gln Asn Arg Arg Gly Leu Asp Leu
 435 440 445
 Leu Thr Ala Glu Gln Gly Gly Ile Cys Leu Ala Leu Gln Glu Lys Cys
 450 455 460
 Cys Phe Tyr Val Asn Lys Ser Gly Ile Val Arg Asp Lys Ile Lys Thr
 465 470 475 480
 Leu Gln Glu Glu Leu Glu Arg Arg Arg Lys Asp Leu Ala Ser Asn Pro
 485 490 495
 Leu Trp Thr Gly Leu Gln Gly Leu Leu Pro Tyr Leu Leu Pro Phe Leu
 500 505 510
 Gly Pro Leu Leu Thr Leu Leu Leu Leu Leu Thr Ile Gly Pro Cys Ile
 515 520 525
 Phe Asn Arg Leu Thr Ala Phe Ile Asn Asp Lys Leu Asn Ile Ile His
 530 535 540
 Ala Met Val Leu Thr Gln Gln Tyr Gln Val Leu Arg Thr Asp Glu Glu
 545 550 555 560
 Ala Gln Asp

<210> 3
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Virus endógeno del babuino

5

<400> 3

Asn Arg Leu Thr Ala Phe Ile Asn Asp Lys Leu Asn Ile Ile His Ala
 1 5 10 15

Met Val Leu Thr Gln Gln Tyr Gln Val Leu Arg Thr Asp Glu Glu Ala
 20 25 30

Gln Asp

10 <210> 4

<211> 23

<212> PRT

<213> Virus endógeno del babuino

15 <400> 4

Tyr Leu Leu Pro Phe Leu Gly Pro Leu Leu Thr Leu Leu Leu Leu Leu
 1 5 10 15

Thr Ile Gly Pro Cys Ile Phe
 20

<210> 5

<211> 506

20 <212> PRT

<213> Virus endógeno del babuino

<400> 5

Met Gly Phe Thr Thr Lys Ile Ile Phe Leu Tyr Asn Leu Val Leu Val
 1 5 10 15

Tyr Ala Gly Phe Asp Asp Pro Arg Lys Ala Ile Glu Leu Val Gln Lys
 20 25 30

Arg Tyr Gly Arg Pro Cys Asp Cys Ser Gly Gly Gln Val Ser Glu Pro
 35 40 45

Pro Ser Asp Arg Val Ser Gln Val Thr Cys Ser Gly Lys Thr Ala Tyr
 50 55 60

25

Leu Met Pro Asp Gln Arg Trp Lys Cys Lys Ser Ile Pro Lys Asp Thr
 65 70 75 80

ES 2 642 276 T3

Ser Pro Ser Gly Pro Leu Gln Glu Cys Pro Cys Asn Ser Tyr Gln Ser
 85 90 95
 Ser Val His Ser Ser Cys Tyr Thr Ser Tyr Gln Gln Cys Arg Ser Gly
 100 105 110
 Asn Lys Thr Tyr Tyr Thr Ala Thr Leu Leu Lys Thr Gln Thr Gly Gly
 115 120 125
 Thr Ser Asp Val Gln Val Leu Gly Ser Thr Asn Lys Leu Ile Gln Ser
 130 135 140
 Pro Cys Asn Gly Ile Lys Gly Gln Ser Ile Cys Trp Ser Thr Thr Ala
 145 150 155 160
 Pro Ile His Val Ser Asp Gly Gly Gly Pro Leu Asp Thr Thr Arg Ile
 165 170 175
 Lys Ser Val Gln Arg Lys Leu Glu Glu Ile His Lys Ala Leu Tyr Pro
 180 185 190
 Glu Leu Gln Tyr His Pro Leu Ala Ile Pro Lys Val Arg Asp Asn Leu
 195 200 205
 Met Val Asp Ala Gln Thr Leu Asn Ile Leu Asn Ala Thr Tyr Asn Leu
 210 215 220
 Leu Leu Met Ser Asn Thr Ser Leu Val Asp Asp Cys Trp Leu Cys Leu
 225 230 235 240
 Lys Leu Gly Pro Pro Thr Pro Leu Ala Ile Pro Asn Phe Leu Leu Ser
 245 250 255
 Tyr Val Thr Arg Ser Ser Asp Asn Ile Ser Cys Leu Ile Ile Pro Pro
 260 265 270
 Leu Leu Val Gln Pro Met Gln Phe Ser Asn Ser Ser Cys Leu Phe Ser
 275 280 285
 Pro Ser Tyr Asn Ser Thr Glu Glu Ile Asp Leu Gly His Val Ala Phe
 290 295 300
 Ser Asn Cys Thr Ser Ile Thr Asn Val Thr Gly Pro Ile Cys Ala Val
 305 310 315 320
 Asn Gly Ser Val Phe Leu Cys Gly Asn Asn Met Ala Tyr Thr Tyr Leu
 325 330 335

ES 2 642 276 T3

Pro Thr Asn Trp Thr Gly Leu Cys Val Leu Ala Thr Leu Leu Pro Asp
340 345 350

Ile Asp Ile Ile Pro Gly Asp Glu Pro Val Pro Ile Pro Ala Ile Asp
355 360 365

His Phe Ile Tyr Arg Pro Lys Arg Ala Ile Gln Phe Ile Pro Leu Leu
370 375 380

Ala Gly Leu Gly Ile Thr Ala Ala Phe Thr Thr Gly Ala Thr Gly Leu
385 390 395 400

Gly Val Ser Val Thr Gln Tyr Thr Lys Leu Ser Asn Gln Leu Ile Ser
405 410 415

Asp Val Gln Ile Leu Ser Ser Thr Ile Gln Asp Leu Gln Asp Gln Val
420 425 430

Asp Ser Leu Ala Glu Val Val Leu Gln Asn Arg Arg Gly Leu Asp Leu
435 440 445

Leu Thr Ala Glu Gln Gly Gly Ile Cys Leu Ala Leu Gln Glu Lys Cys
450 455 460

Cys Phe Tyr Val Asn Lys Ser Gly Ile Val Arg Asp Lys Ile Lys Thr
465 470 475 480

Leu Gln Glu Glu Leu Glu Arg Arg Arg Lys Asp Leu Ala Ser Asn Pro
485 490 495

Leu Trp Thr Gly Leu Gln Gly Leu Leu Pro
500 505

<210> 6

<211> 17

5 <212> PRT

<213> Virus endógeno del babuino

<400> 6

Val Leu Thr Gln Gln Tyr Gln Val Leu Arg Thr Asp Glu Glu Ala Gln
1 5 10 15

10

Asp

<210> 7

<211> 546

<212> PRT

15 <213> Artificial

ES 2 642 276 T3

<220>

<223> BaEVRless

<400> 7

5

```

Met Gly Phe Thr Thr Lys Ile Ile Phe Leu Tyr Asn Leu Val Leu Val
 1           5           10           15

Tyr Ala Gly Phe Asp Asp Pro Arg Lys Ala Ile Glu Leu Val Gln Lys
 20           25           30

Arg Tyr Gly Arg Pro Cys Asp Cys Ser Gly Gly Gln Val Ser Glu Pro
 35           40           45

Pro Ser Asp Arg Val Ser Gln Val Thr Cys Ser Gly Lys Thr Ala Tyr
 50           55           60

Leu Met Pro Asp Gln Arg Trp Lys Cys Lys Ser Ile Pro Lys Asp Thr
 65           70           75           80

Ser Pro Ser Gly Pro Leu Gln Glu Cys Pro Cys Asn Ser Tyr Gln Ser
 85           90           95

Ser Val His Ser Ser Cys Tyr Thr Ser Tyr Gln Gln Cys Arg Ser Gly
 100          105          110

Asn Lys Thr Tyr Tyr Thr Ala Thr Leu Leu Lys Thr Gln Thr Gly Gly
 115          120          125

Thr Ser Asp Val Gln Val Leu Gly Ser Thr Asn Lys Leu Ile Gln Ser
 130          135          140

Pro Cys Asn Gly Ile Lys Gly Gln Ser Ile Cys Trp Ser Thr Thr Ala
 145          150          155          160

Pro Ile His Val Ser Asp Gly Gly Gly Pro Leu Asp Thr Thr Arg Ile
 165          170          175

Lys Ser Val Gln Arg Lys Leu Glu Glu Ile His Lys Ala Leu Tyr Pro
 180          185          190

Glu Leu Gln Tyr His Pro Leu Ala Ile Pro Lys Val Arg Asp Asn Leu
 195          200          205

Met Val Asp Ala Gln Thr Leu Asn Ile Leu Asn Ala Thr Tyr Asn Leu
 210          215          220

```

ES 2 642 276 T3

Leu Leu Met Ser Asn Thr Ser Leu Val Asp Asp Cys Trp Leu Cys Leu
 225 230 235 240
 Lys Leu Gly Pro Pro Thr Pro Leu Ala Ile Pro Asn Phe Leu Leu Ser
 245 250 255
 Tyr Val Thr Arg Ser Ser Asp Asn Ile Ser Cys Leu Ile Ile Pro Pro
 260 265 270
 Leu Leu Val Gln Pro Met Gln Phe Ser Asn Ser Ser Cys Leu Phe Ser
 275 280 285
 Pro Ser Tyr Asn Ser Thr Glu Glu Ile Asp Leu Gly His Val Ala Phe
 290 295 300
 Ser Asn Cys Thr Ser Ile Thr Asn Val Thr Gly Pro Ile Cys Ala Val
 305 310 315 320
 Asn Gly Ser Val Phe Leu Cys Gly Asn Asn Met Ala Tyr Thr Tyr Leu
 325 330 335
 Pro Thr Asn Trp Thr Gly Leu Cys Val Leu Ala Thr Leu Leu Pro Asp
 340 345 350
 Ile Asp Ile Ile Pro Gly Asp Glu Pro Val Pro Ile Pro Ala Ile Asp
 355 360 365
 His Phe Ile Tyr Arg Pro Lys Arg Ala Ile Gln Phe Ile Pro Leu Leu
 370 375 380
 Ala Gly Leu Gly Ile Thr Ala Ala Phe Thr Thr Gly Ala Thr Gly Leu
 385 390 395 400
 Gly Val Ser Val Thr Gln Tyr Thr Lys Leu Ser Asn Gln Leu Ile Ser
 405 410 415
 Asp Val Gln Ile Leu Ser Ser Thr Ile Gln Asp Leu Gln Asp Gln Val
 420 425 430
 Asp Ser Leu Ala Glu Val Val Leu Gln Asn Arg Arg Gly Leu Asp Leu
 435 440 445
 Leu Thr Ala Glu Gln Gly Gly Ile Cys Leu Ala Leu Gln Glu Lys Cys
 450 455 460
 Cys Phe Tyr Val Asn Lys Ser Gly Ile Val Arg Asp Lys Ile Lys Thr
 465 470 475 480

ES 2 642 276 T3

Leu Gln Glu Glu Leu Glu Arg Arg Arg Lys Asp Leu Ala Ser Asn Pro
485 490 495

Leu Trp Thr Gly Leu Gln Gly Leu Leu Pro Tyr Leu Leu Pro Phe Leu
500 505 510

Gly Pro Leu Leu Thr Leu Leu Leu Leu Thr Ile Gly Pro Cys Ile
515 520 525

Phe Asn Arg Leu Thr Ala Phe Ile Asn Asp Lys Leu Asn Ile Ile His
530 535 540

Ala Met
545

<210> 8

<211> 33

5 <212> PRT

<213> Virus de la leucemia murina

<400> 8

Asn Arg Leu Val Gln Phe Val Lys Asp Arg Ile Ser Val Val Gln Ala
1 5 10 15

Leu Val Leu Thr Gln Gln Tyr His Gln Leu Lys Pro Leu Glu Tyr Glu
20 25 30

10

Pro

<210> 9

<211> 562

<212> PRT

15 <213> Artificial

<220>

<223> BaEV/TR

20 <400> 9

Met Gly Phe Thr Thr Lys Ile Ile Phe Leu Tyr Asn Leu Val Leu Val
1 5 10 15

Tyr Ala Gly Phe Asp Asp Pro Arg Lys Ala Ile Glu Leu Val Gln Lys
20 25 30

Arg Tyr Gly Arg Pro Cys Asp Cys Ser Gly Gly Gln Val Ser Glu Pro
35 40 45

Pro Ser Asp Arg Val Ser Gln Val Thr Cys Ser Gly Lys Thr Ala Tyr

ES 2 642 276 T3

50		55		60
Leu Met Pro Asp Gln Arg Trp Lys Cys Lys Ser Ile Pro Lys Asp Thr				
65		70		75
Ser Pro Ser Gly Pro Leu Gln Glu Cys Pro Cys Asn Ser Tyr Gln Ser				
	85		90	
Ser Val His Ser Ser Cys Tyr Thr Ser Tyr Gln Gln Cys Arg Ser Gly				
	100		105	110
Asn Lys Thr Tyr Tyr Thr Ala Thr Leu Leu Lys Thr Gln Thr Gly Gly				
	115		120	125
Thr Ser Asp Val Gln Val Leu Gly Ser Thr Asn Lys Leu Ile Gln Ser				
	130		135	140
Pro Cys Asn Gly Ile Lys Gly Gln Ser Ile Cys Trp Ser Thr Thr Ala				
145		150		155
Pro Ile His Val Ser Asp Gly Gly Gly Pro Leu Asp Thr Thr Arg Ile				
	165		170	175
Lys Ser Val Gln Arg Lys Leu Glu Glu Ile His Lys Ala Leu Tyr Pro				
	180		185	190
Glu Leu Gln Tyr His Pro Leu Ala Ile Pro Lys Val Arg Asp Asn Leu				
	195		200	205
Met Val Asp Ala Gln Thr Leu Asn Ile Leu Asn Ala Thr Tyr Asn Leu				
	210		215	220
Leu Leu Met Ser Asn Thr Ser Leu Val Asp Asp Cys Trp Leu Cys Leu				
225		230		235
Lys Leu Gly Pro Pro Thr Pro Leu Ala Ile Pro Asn Phe Leu Leu Ser				
	245		250	255
Tyr Val Thr Arg Ser Ser Asp Asn Ile Ser Cys Leu Ile Ile Pro Pro				
	260		265	270
Leu Leu Val Gln Pro Met Gln Phe Ser Asn Ser Ser Cys Leu Phe Ser				
	275		280	285
Pro Ser Tyr Asn Ser Thr Glu Glu Ile Asp Leu Gly His Val Ala Phe				
	290		295	300

ES 2 642 276 T3

Ser Asn Cys Thr Ser Ile Thr Asn Val Thr Gly Pro Ile Cys Ala Val
 305 310 315 320
 Asn Gly Ser Val Phe Leu Cys Gly Asn Asn Met Ala Tyr Thr Tyr Leu
 325 330 335
 Pro Thr Asn Trp Thr Gly Leu Cys Val Leu Ala Thr Leu Leu Pro Asp
 340 345 350
 Ile Asp Ile Ile Pro Gly Asp Glu Pro Val Pro Ile Pro Ala Ile Asp
 355 360 365
 His Phe Ile Tyr Arg Pro Lys Arg Ala Ile Gln Phe Ile Pro Leu Leu
 370 375 380
 Ala Gly Leu Gly Ile Thr Ala Ala Phe Thr Thr Gly Ala Thr Gly Leu
 385 390 395 400
 Gly Val Ser Val Thr Gln Tyr Thr Lys Leu Ser Asn Gln Leu Ile Ser
 405 410 415
 Asp Val Gln Ile Leu Ser Ser Thr Ile Gln Asp Leu Gln Asp Gln Val
 420 425 430
 Asp Ser Leu Ala Glu Val Val Leu Gln Asn Arg Arg Gly Leu Asp Leu
 435 440 445
 Leu Thr Ala Glu Gln Gly Gly Ile Cys Leu Ala Leu Gln Glu Lys Cys
 450 455 460
 Cys Phe Tyr Val Asn Lys Ser Gly Ile Val Arg Asp Lys Ile Lys Thr
 465 470 475 480
 Leu Gln Glu Glu Leu Glu Arg Arg Arg Lys Asp Leu Ala Ser Asn Pro
 485 490 495
 Leu Trp Thr Gly Leu Gln Gly Leu Leu Pro Tyr Leu Leu Pro Phe Leu
 500 505 510
 Gly Pro Leu Leu Thr Leu Leu Leu Leu Thr Ile Gly Pro Cys Ile
 515 520 525
 Phe Asn Arg Leu Val Gln Phe Val Lys Asp Arg Ile Ser Val Val Gln
 530 535 540
 Ala Leu Val Leu Thr Gln Gln Tyr His Gln Leu Lys Pro Leu Glu Tyr
 545 550 555 560

ES 2 642 276 T3

<210> 10
 <211> 273
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens

<400> 10

```

Met Lys Lys Thr Gln Thr Trp Ile Leu Thr Cys Ile Tyr Leu Gln Leu
1          5          10          15

Leu Leu Phe Asn Pro Leu Val Lys Thr Glu Gly Ile Cys Arg Asn Arg
          20          25          30

Val Thr Asn Asn Val Lys Asp Val Thr Lys Leu Val Ala Asn Leu Pro
          35          40          45

Lys Asp Tyr Met Ile Thr Leu Lys Tyr Val Pro Gly Met Asp Val Leu
          50          55          60

Pro Ser His Cys Trp Ile Ser Glu Met Val Val Gln Leu Ser Asp Ser
65          70          75          80

Leu Thr Asp Leu Leu Asp Lys Phe Ser Asn Ile Ser Glu Gly Leu Ser
          85          90          95

Asn Tyr Ser Ile Ile Asp Lys Leu Val Asn Ile Val Asp Asp Leu Val
          100          105          110

Glu Cys Val Lys Glu Asn Ser Ser Lys Asp Leu Lys Lys Ser Phe Lys
          115          120          125

Ser Pro Glu Pro Arg Leu Phe Thr Pro Glu Glu Phe Phe Arg Ile Phe
          130          135          140

Asn Arg Ser Ile Asp Ala Phe Lys Asp Phe Val Val Ala Ser Glu Thr
          145          150          155          160

Ser Asp Cys Val Val Ser Ser Thr Leu Ser Pro Glu Lys Asp Ser Arg
          165          170          175

Val Ser Val Thr Lys Pro Phe Met Leu Pro Pro Val Ala Ala Ser Ser
          180          185          190

Leu Arg Asn Asp Ser Ser Ser Ser Asn Arg Lys Ala Lys Asn Pro Pro
          195          200          205

```

ES 2 642 276 T3

Gly Asp Ser Ser Leu His Trp Ala Ala Met Ala Leu Pro Ala Leu Phe
210 215 220

Ser Leu Ile Ile Gly Phe Ala Phe Gly Ala Leu Tyr Trp Lys Lys Arg
225 230 235 240

Gln Pro Ser Leu Thr Arg Ala Val Glu Asn Ile Gln Ile Asn Glu Glu
245 250 255

Asp Asn Glu Ile Ser Met Leu Gln Glu Lys Glu Arg Glu Phe Gln Glu
260 265 270

Val

<210> 11

<211> 353

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Met Glu Leu Thr Glu Leu Leu Leu Val Val Met Leu Leu Leu Thr Ala
1 5 10 15

Arg Leu Thr Leu Ser Ser Pro Ala Pro Pro Ala Cys Asp Leu Arg Val
20 25 30

Leu Ser Lys Leu Leu Arg Asp Ser His Val Leu His Ser Arg Leu Ser
35 40 45

Gln Cys Pro Glu Val His Pro Leu Pro Thr Pro Val Leu Leu Pro Ala
50 55 60

Val Asp Phe Ser Leu Gly Glu Trp Lys Thr Gln Met Glu Glu Thr Lys
65 70 75 80

Ala Gln Asp Ile Leu Gly Ala Val Thr Leu Leu Leu Glu Gly Val Met
85 90 95

Ala Ala Arg Gly Gln Leu Gly Pro Thr Cys Leu Ser Ser Leu Leu Gly
100 105 110

Gln Leu Ser Gly Gln Val Arg Leu Leu Leu Gly Ala Leu Gln Ser Leu
115 120 125

Leu Gly Thr Gln Leu Pro Pro Gln Gly Arg Thr Thr Ala His Lys Asp
130 135 140

10

ES 2 642 276 T3

Pro Asn Ala Ile Phe Leu Ser Phe Gln His Leu Leu Arg Gly Lys Val
145 150 155 160

Arg Phe Leu Met Leu Val Gly Gly Ser Thr Leu Cys Val Arg Arg Ala
165 170 175

Pro Pro Thr Thr Ala Val Pro Ser Arg Thr Ser Leu Val Leu Thr Leu
180 185 190

Asn Glu Leu Pro Asn Arg Thr Ser Gly Leu Leu Glu Thr Asn Phe Thr
195 200 205

Ala Ser Ala Arg Thr Thr Gly Ser Gly Leu Leu Lys Trp Gln Gln Gly
210 215 220

Phe Arg Ala Lys Ile Pro Gly Leu Leu Asn Gln Thr Ser Arg Ser Leu
225 230 235 240

Asp Gln Ile Pro Gly Tyr Leu Asn Arg Ile His Glu Leu Leu Asn Gly
245 250 255

Thr Arg Gly Leu Phe Pro Gly Pro Ser Arg Arg Thr Leu Gly Ala Pro
260 265 270

Asp Ile Ser Ser Gly Thr Ser Asp Thr Gly Ser Leu Pro Pro Asn Leu
275 280 285

Gln Pro Gly Tyr Ser Pro Ser Pro Thr His Pro Pro Thr Gly Gln Tyr
290 295 300

Thr Leu Phe Pro Leu Pro Pro Thr Leu Pro Thr Pro Val Val Gln Leu
305 310 315 320

His Pro Leu Leu Pro Asp Pro Ser Ala Pro Thr Pro Thr Pro Thr Ser
325 330 335

Pro Leu Leu Asn Thr Ser Tyr Thr His Ser Gln Asn Leu Ser Gln Glu
340 345 350

Gly

<210> 12

<211> 153

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

ES 2 642 276 T3

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
1 5 10 15

Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
20 25 30

Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile
35 40 45

Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe
50 55 60

Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu
65 70 75 80

Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys
85 90 95

Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile
100 105 110

Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala
115 120 125

Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe
130 135 140

Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
145 150

<210> 13

<211> 177

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Met Phe His Val Ser Phe Arg Tyr Ile Phe Gly Leu Pro Pro Leu Ile
1 5 10 15

Leu Val Leu Leu Pro Val Ala Ser Ser Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys
20 25 30

Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu Met Val Ser Ile Asp Gln Leu
35 40 45

Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe
50 55 60

10

ES 2 642 276 T3

Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe
65 70 75 80

Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser
85 90 95

Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu Leu Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr
100 105 110

Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Val Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala
115 120 125

Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu
130 135 140

Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu
145 150 155 160

Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu
165 170 175

His

<210> 14

<211> 136

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Ala Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys
20 25 30

Lys Ile Glu Asp Leu Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr
35 40 45

Thr Glu Ser Asp Val His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys
50 55 60

Phe Leu Leu Glu Leu Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser
65 70 75 80

Ile His Asp Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu
85 90 95

ES 2 642 276 T3

Ser Ser Asn Gly Asn Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu
100 105 110

Leu Glu Glu Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile
115 120 125

Val Gln Met Phe Ile Asn Thr Ser
130 135

<210> 15

<211> 235

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Met Thr Val Leu Ala Pro Ala Trp Ser Pro Thr Thr Tyr Leu Leu Leu
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Ser Ser Gly Leu Ser Gly Thr Gln Asp Cys Ser Phe
20 25 30

Gln His Ser Pro Ile Ser Ser Asp Phe Ala Val Lys Ile Arg Glu Leu
35 40 45

Ser Asp Tyr Leu Leu Gln Asp Tyr Pro Val Thr Val Ala Ser Asn Leu
50 55 60

Gln Asp Glu Glu Leu Cys Gly Gly Leu Trp Arg Leu Val Leu Ala Gln
65 70 75 80

Arg Trp Met Glu Arg Leu Lys Thr Val Ala Gly Ser Lys Met Gln Gly
85 90 95

Leu Leu Glu Arg Val Asn Thr Glu Ile His Phe Val Thr Lys Cys Ala
100 105 110

Phe Gln Pro Pro Pro Ser Cys Leu Arg Phe Val Gln Thr Asn Ile Ser
115 120 125

Arg Leu Leu Gln Glu Thr Ser Glu Gln Leu Val Ala Leu Lys Pro Trp
130 135 140

Ile Thr Arg Gln Asn Phe Ser Arg Cys Leu Glu Leu Gln Cys Gln Pro
145 150 155 160

Asp Ser Ser Thr Leu Pro Pro Pro Trp Ser Pro Arg Pro Leu Glu Ala
165 170 175

10

ES 2 642 276 T3

Thr Ala Pro Thr Ala Pro Gln Pro Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu
180 185 190

Pro Val Gly Leu Leu Leu Leu Ala Ala Ala Trp Cys Leu His Trp Gln
195 200 205

Arg Thr Arg Arg Arg Thr Pro Arg Pro Gly Glu Gln Val Pro Pro Val
210 215 220

Pro Ser Pro Gln Asp Leu Leu Leu Val Glu His
225 230 235

REIVINDICACIONES

1. Una partícula de vector viral pseudotipado para transferir material biológico a las células, en la que dicha partícula de vector comprende al menos:
5 una glicoproteína de envoltura quimérica que comprende o consiste en una fusión del dominio transmembrana y extracelular de una glicoproteína de envoltura de retrovirus endógeno de babuino (BaEV) y el dominio de cola citoplásmica de una glicoproteína de envoltura del virus de leucemia murina (MLV); o una glicoproteína de envoltura de BaEV modificada en la que el dominio de la cola citoplásmica está desprovisto del péptido R inhibidor de la fusión.
10
2. La partícula de vector viral pseudotipado de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la partícula de vector viral es una partícula de vector lentiviral.
- 15 3. La partícula de vector viral pseudotipado de acuerdo con la reivindicación 2, en la que la partícula de vector lentiviral se selecciona del grupo que consiste en VIH y VIS.
4. La partícula de vector viral pseudotipado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el material biológico es uno o más ácidos nucleicos.
20
5. La partícula de vector viral pseudotipado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicha partícula de vector viral muestra además al menos una citocina seleccionada del grupo que consiste en el factor de células madre (SCF), trombopoyetina (TPO), IL-2, IL-15 e IL-7.
- 25 6. La partícula de vector viral pseudotipado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la partícula de vector viral pseudotipado está destinado a transferir material biológico en las células hematopoyéticas.
7. La partícula de vector viral pseudotipado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para su uso en el tratamiento de un trastorno hematopoyético o una enfermedad autoinmune.
30
8. La partícula de vector viral pseudotipado para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en la que el trastorno hematopoyético se selecciona del grupo que consiste en anemia de Fanconi, hemofilia, beta-talasemia, síndrome de Wiskott-Aldrich, inmunodeficiencia combinada grave unida al cromosoma, deficiencia de adenosina-desaminasa, enfermedad granulomatosa crónica y adrenoleucodistrofia.
35
9. Un método para producir una partícula de vector viral pseudotipado que comprende:
a) transfectar una célula con:
40 (i) al menos una primera secuencia de ácido nucleico que comprende un genoma de origen retroviral capaz de encapsidarse;
(ii) al menos una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende un ADNc que codifica proteínas centrales de dicho retrovirus, y
45 (iii) al menos una tercera secuencia de ácido nucleico que comprende un ADNc que codifica:
una glicoproteína de envoltura quimérica que comprende o consiste en una fusión del dominio transmembrana y extracelular de una glicoproteína de envoltura de retrovirus endógeno de babuino (BaEV) y el dominio de cola citoplásmica de una glicoproteína de envoltura del virus de leucemia murina (MLV); o
una glicoproteína de envoltura de BaEV modificada en la que el dominio de la cola citoplásmica está desprovisto del
50 péptido R inhibidor de la fusión;
para producir una célula productora;
b) mantener la célula productora en cultivo durante el tiempo suficiente para permitir la expresión de los ADNc para producir las proteínas codificadas; y
55 c) permitir que las proteínas codificadas formen partículas de vector viral pseudotipado.
10. Un medicamento que comprende una partícula de vector viral pseudotipado como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 como principio activo.

11. El uso de una partícula de vector viral pseudotipado como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para transferir el material biológico a las células hematopoyéticas *ex vivo*.
- 5 12. Un método *in vitro* para transducir una célula hematopoyética que comprende poner en contacto la célula hematopoyética con una partícula de vector viral pseudotipado como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en condiciones para realizar la transducción de la célula hematopoyética por la partícula de vector viral pseudotipado.
- 10 13. El método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 12, en el que la célula hematopoyética se selecciona del grupo que consiste en células madre hematopoyéticas, células CD34⁺ progenitoras, células CD34⁺ progenitoras muy tempranas, progenitores de CD19⁺ de linfocitos B, células CD13⁺ progenitoras mieloides, linfocitos T, linfocitos B, monocitos, células dendríticas, células CD34⁺ de sangre periférica, linfocitos B de cáncer (BCLL), linfocitos B de linfoma de la zona marginal (MZL) y timocitos.
- 15 14. El método *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 13, en el que la célula hematopoyética no está pre-estimulada con al menos una citocina.
15. Una línea celular de encapsidación de virus estable que produce la partícula de vector viral
- 20 pseudotipado como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la línea celular comprende:
 - (i) al menos una primera secuencia de ácido nucleico que comprende un genoma de origen retroviral capaz de encapsidarse;
 - 25 (ii) al menos una segunda secuencia de ácido nucleico que comprende un ADNc que codifica proteínas centrales de dicho retrovirus, y
 - (iii) al menos una tercera secuencia de ácido nucleico que comprende un ADNc que codifica:
 - una glicoproteína de envoltura quimérica que comprende o consiste en una fusión del dominio transmembrana y extracelular de una glicoproteína de envoltura de retrovirus endógeno de babuino (BaEV) y el dominio de cola
 - 30 citoplásmica de una glicoproteína de envoltura del virus de leucemia murina (MLV); o
 - una glicoproteína de envoltura de BaEV modificada en la que el dominio de la cola citoplásmica está desprovisto del péptido R inhibidor de la fusión.

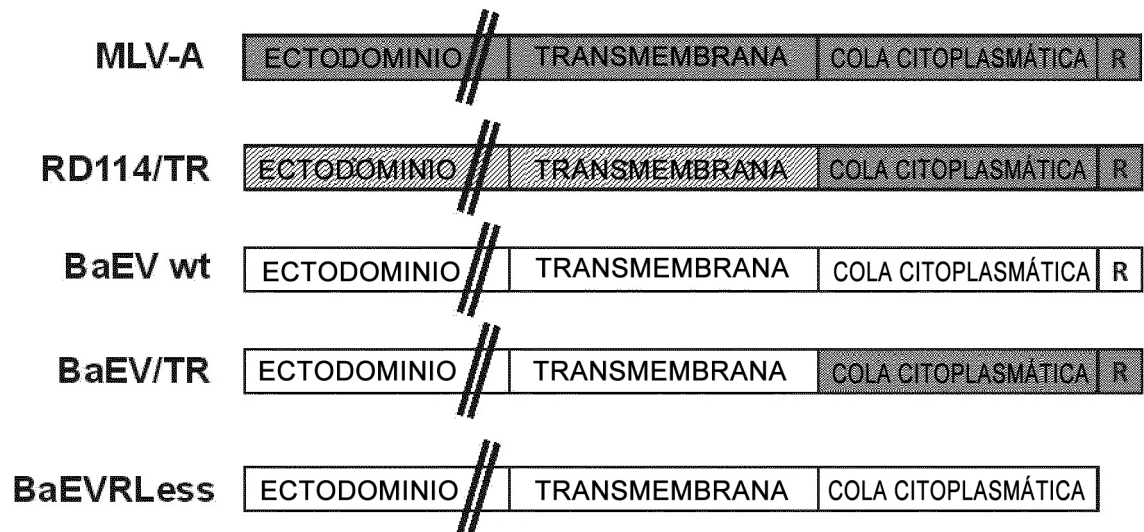


FIG.1

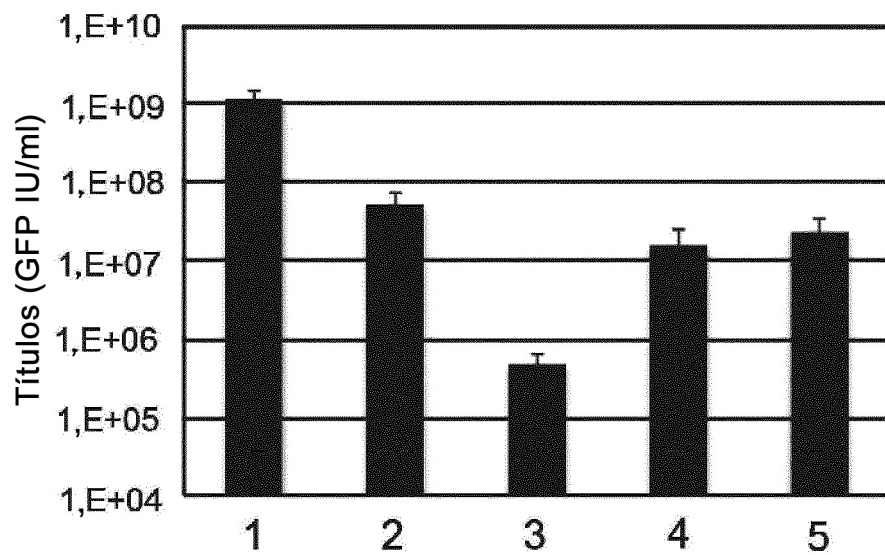


FIG.2

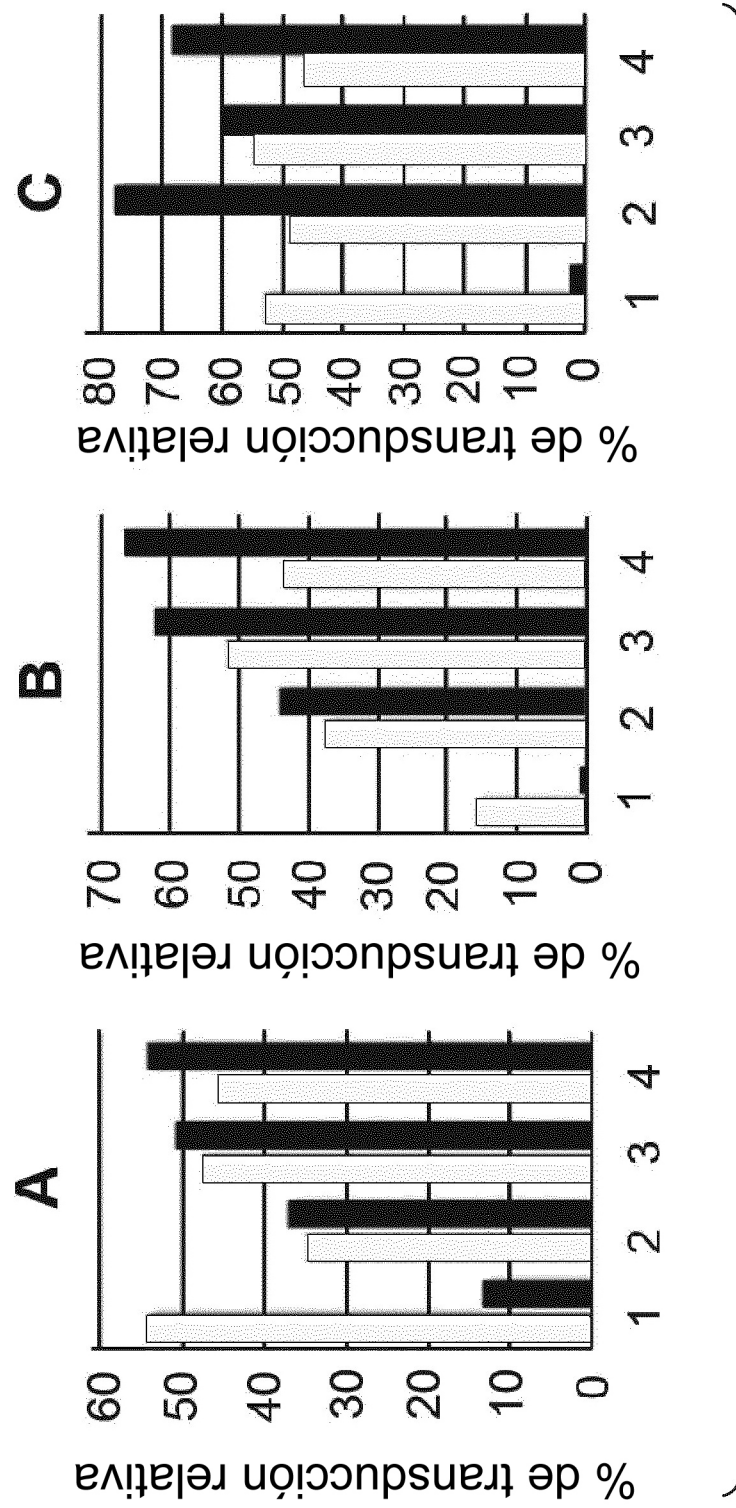


FIG.3

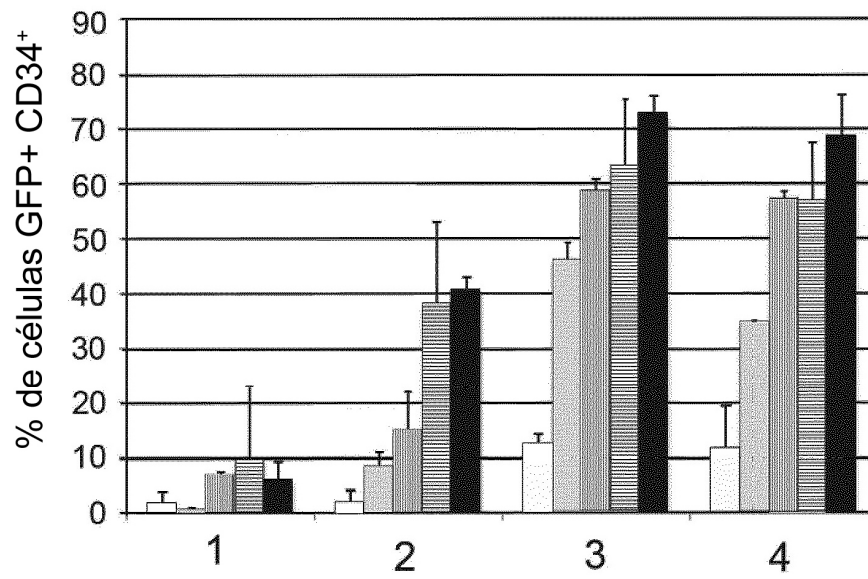


FIG.4

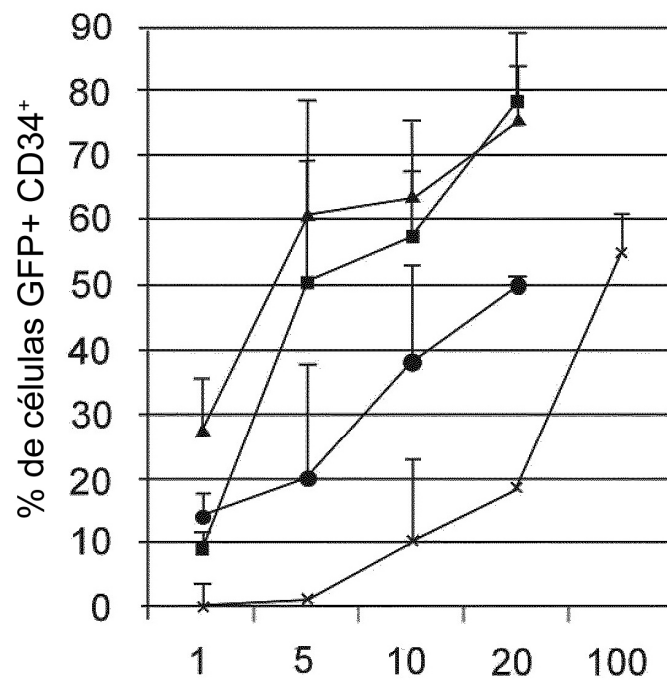


FIG.5

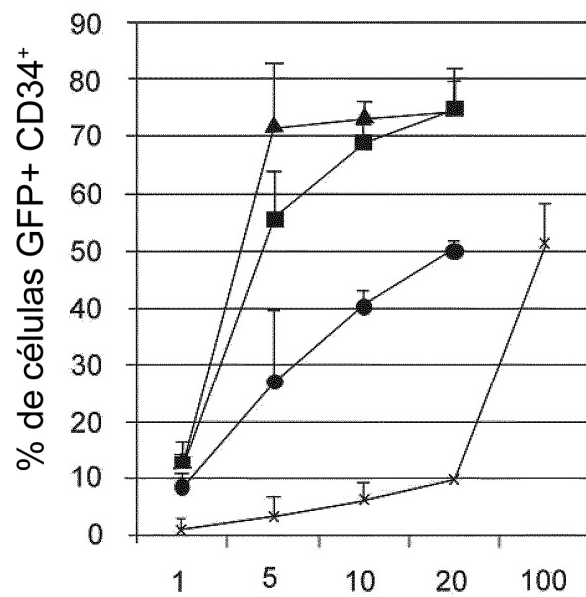


FIG.6

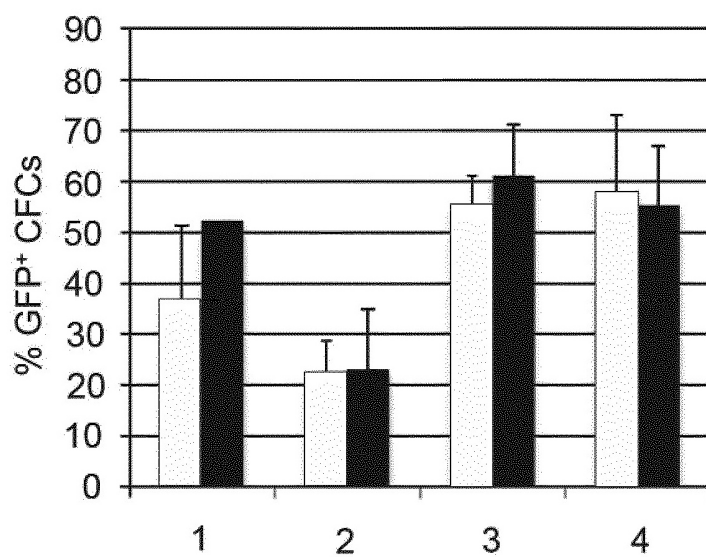


FIG.7

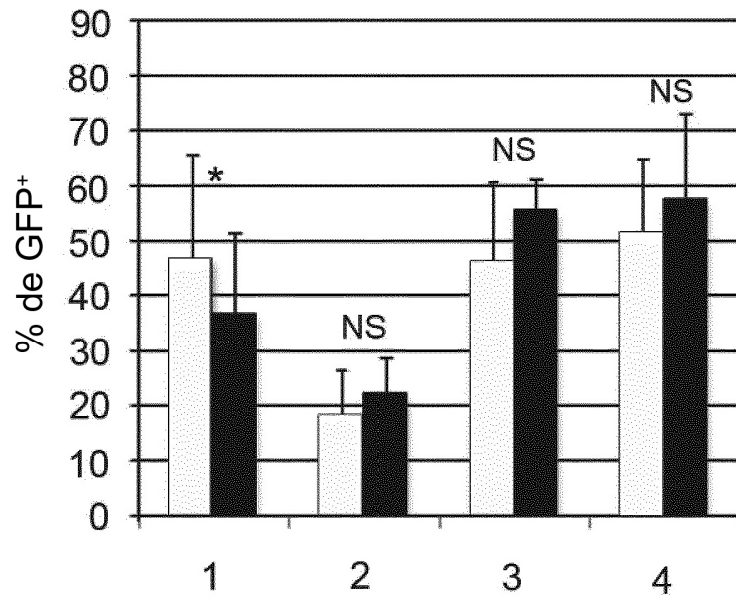


FIG.8

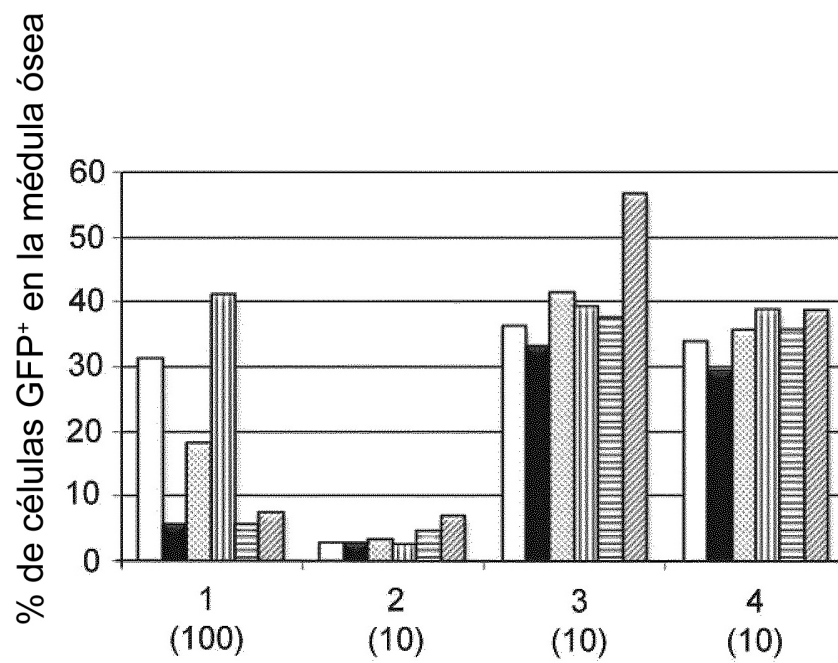


FIG.9

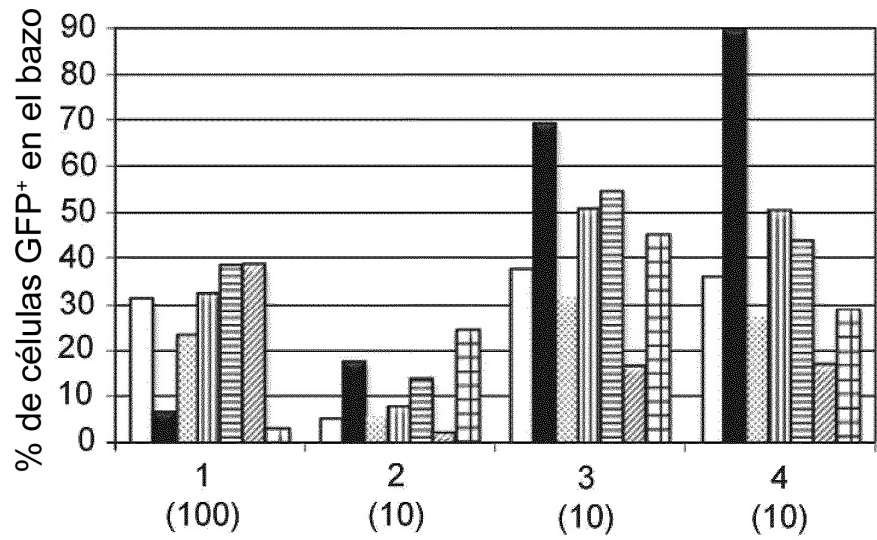


FIG.10

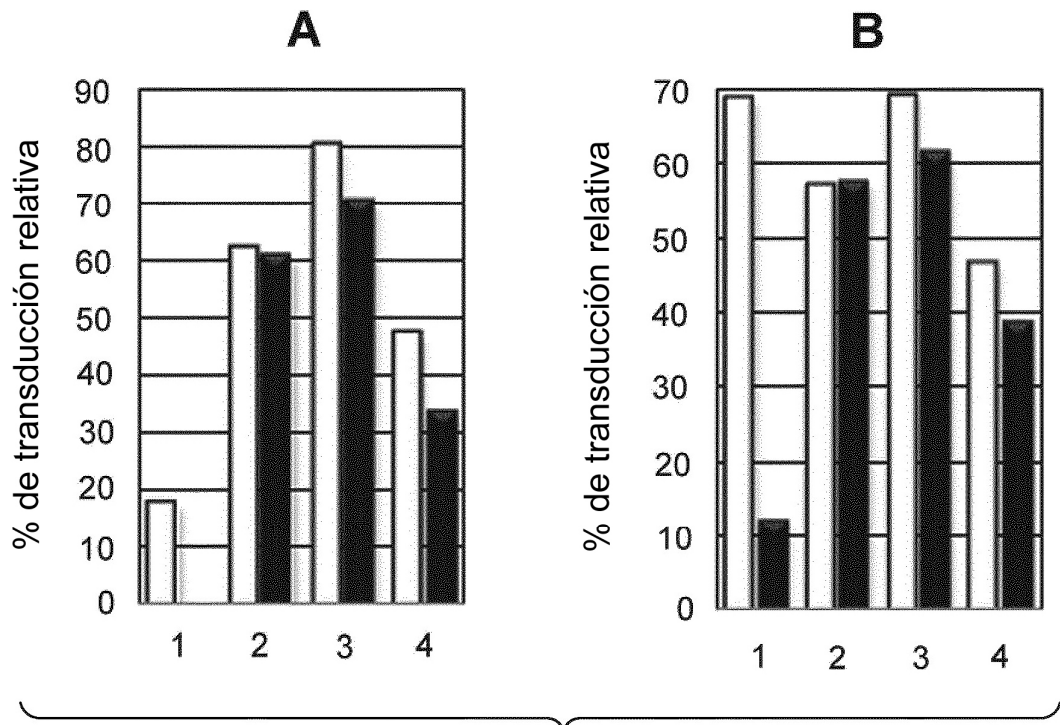


FIG.11

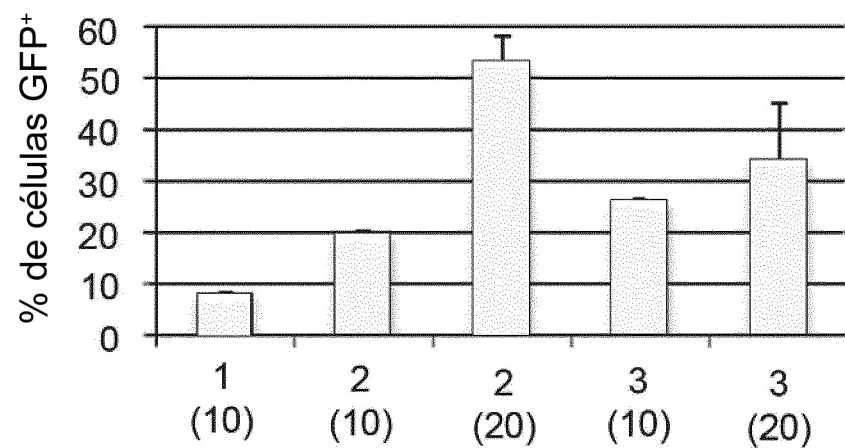


FIG.12

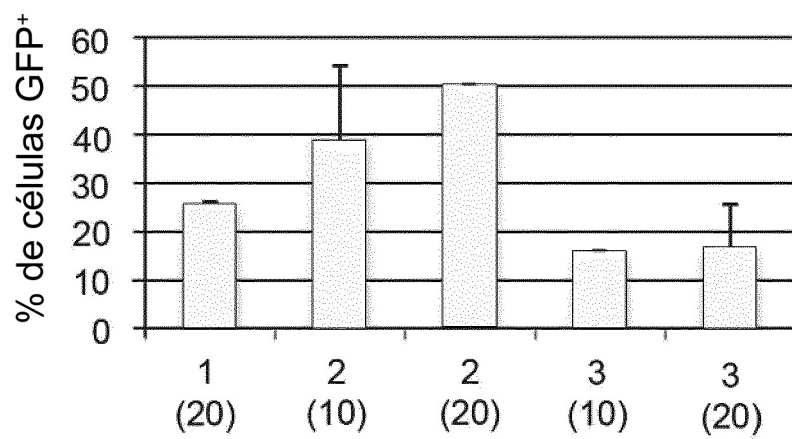


FIG.13

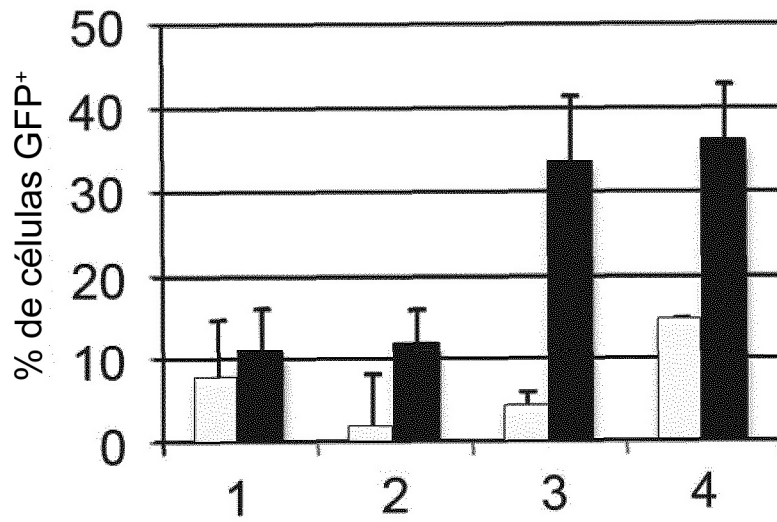


FIG.14

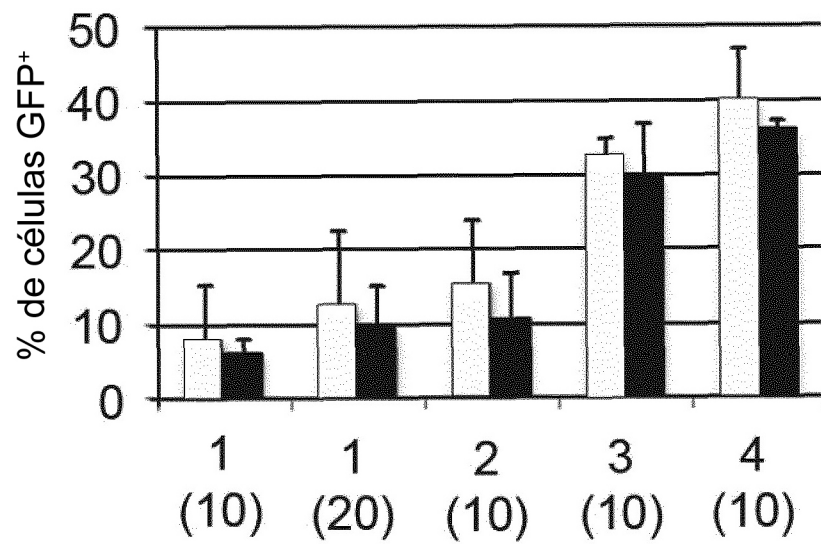


FIG.15

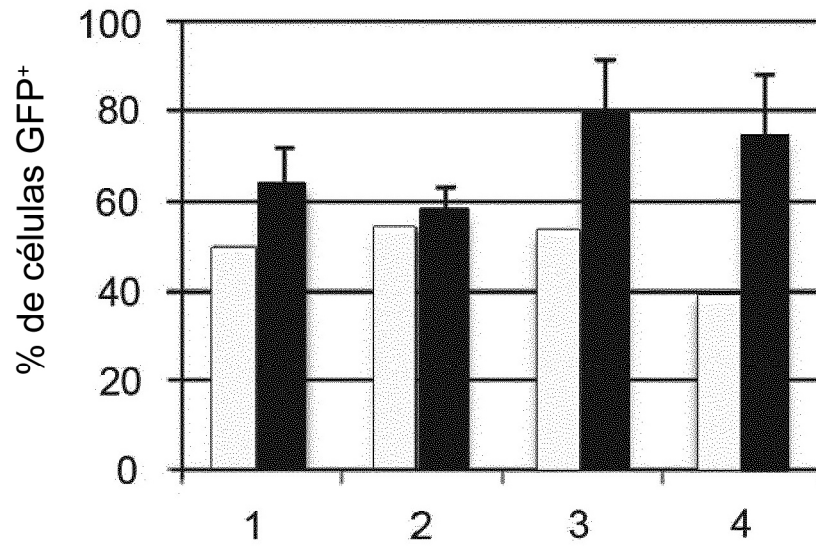


FIG.16

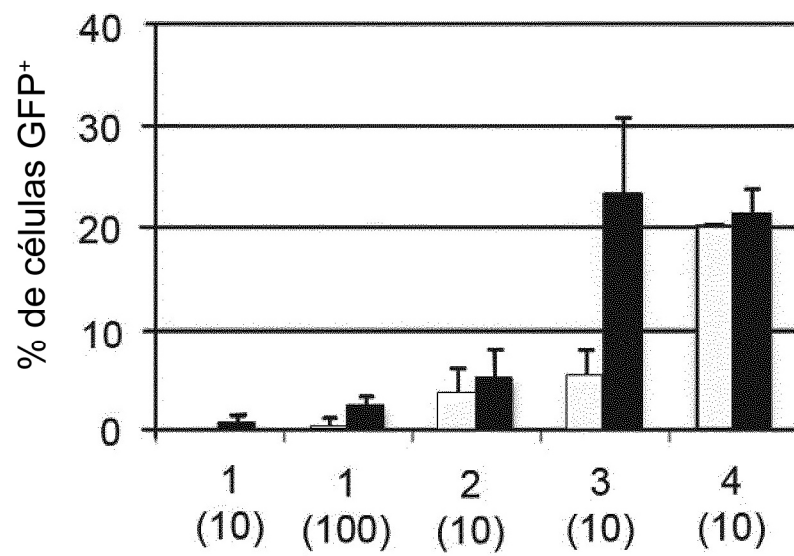


FIG.17

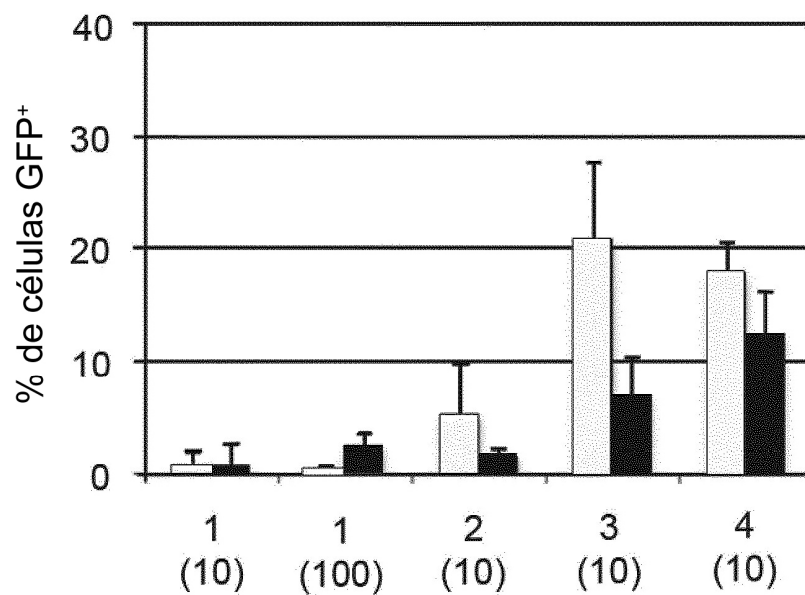


FIG.18

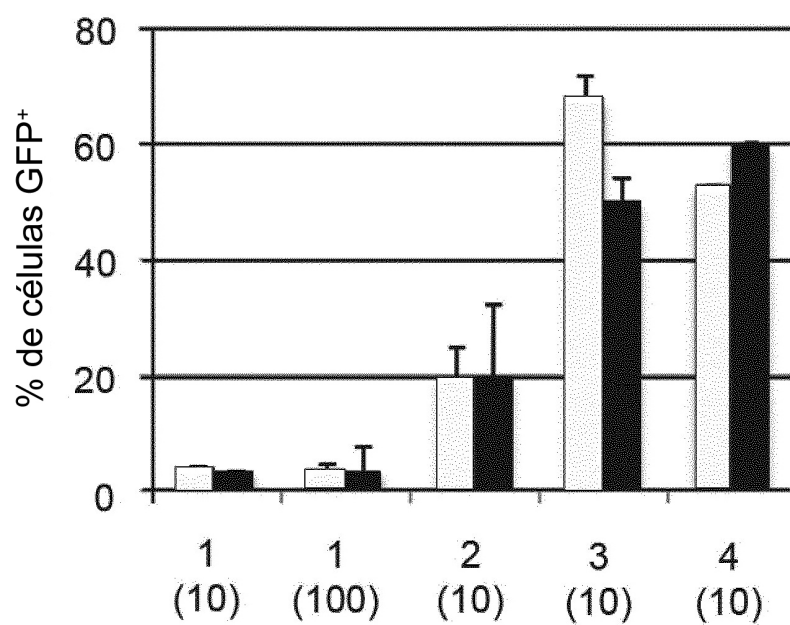


FIG.19

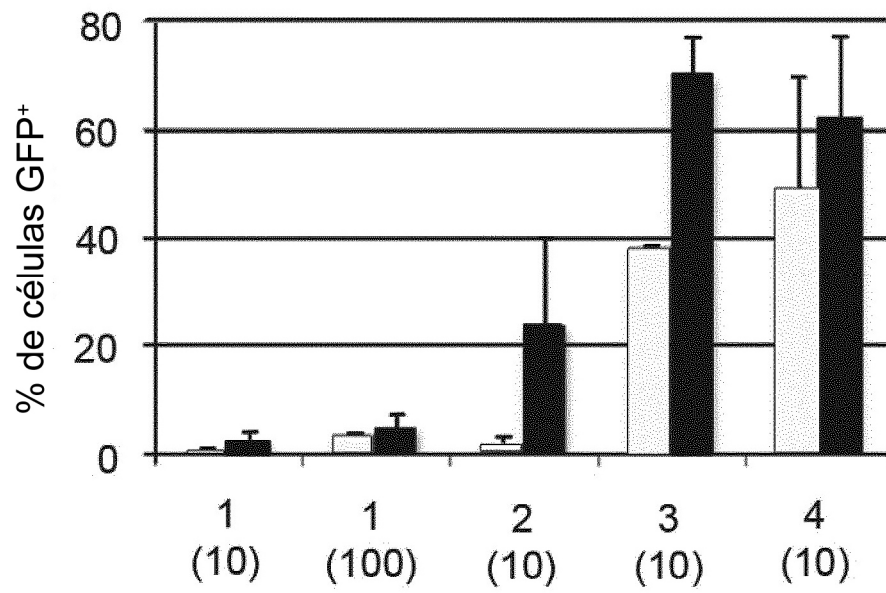
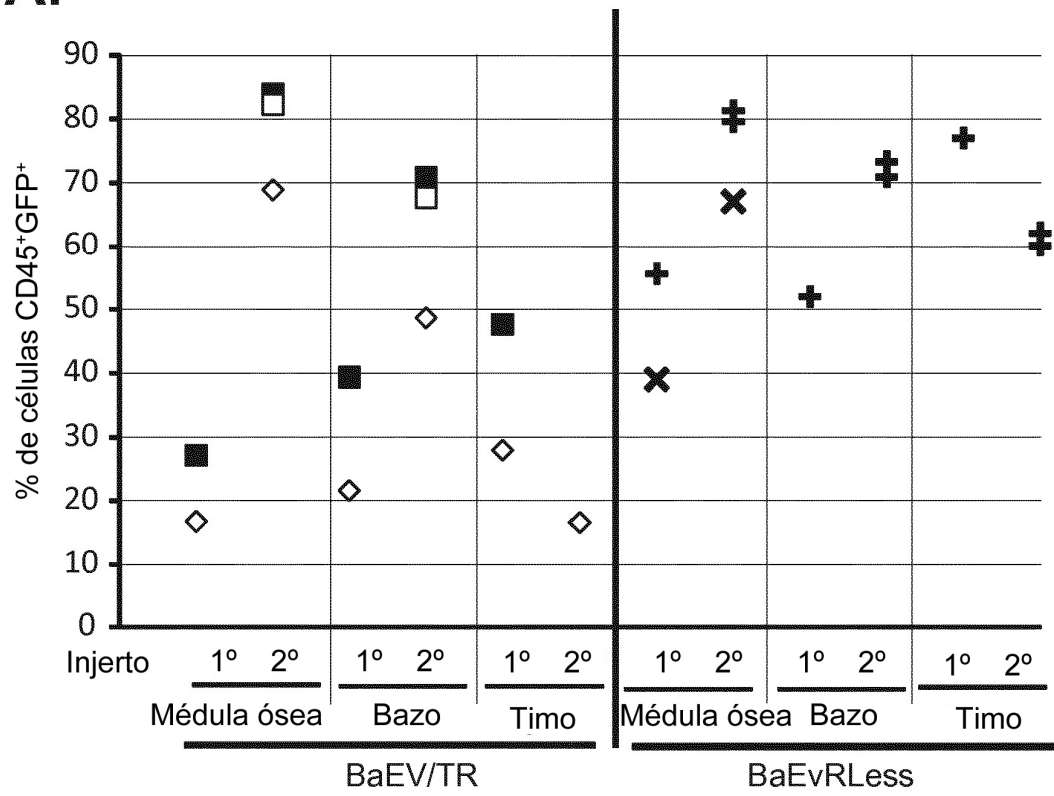


FIG.20

A.



B.

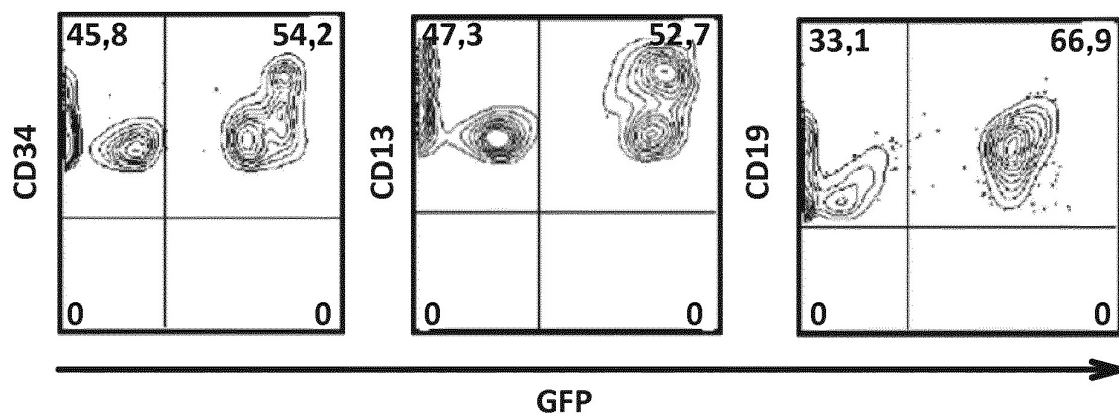


FIG.21

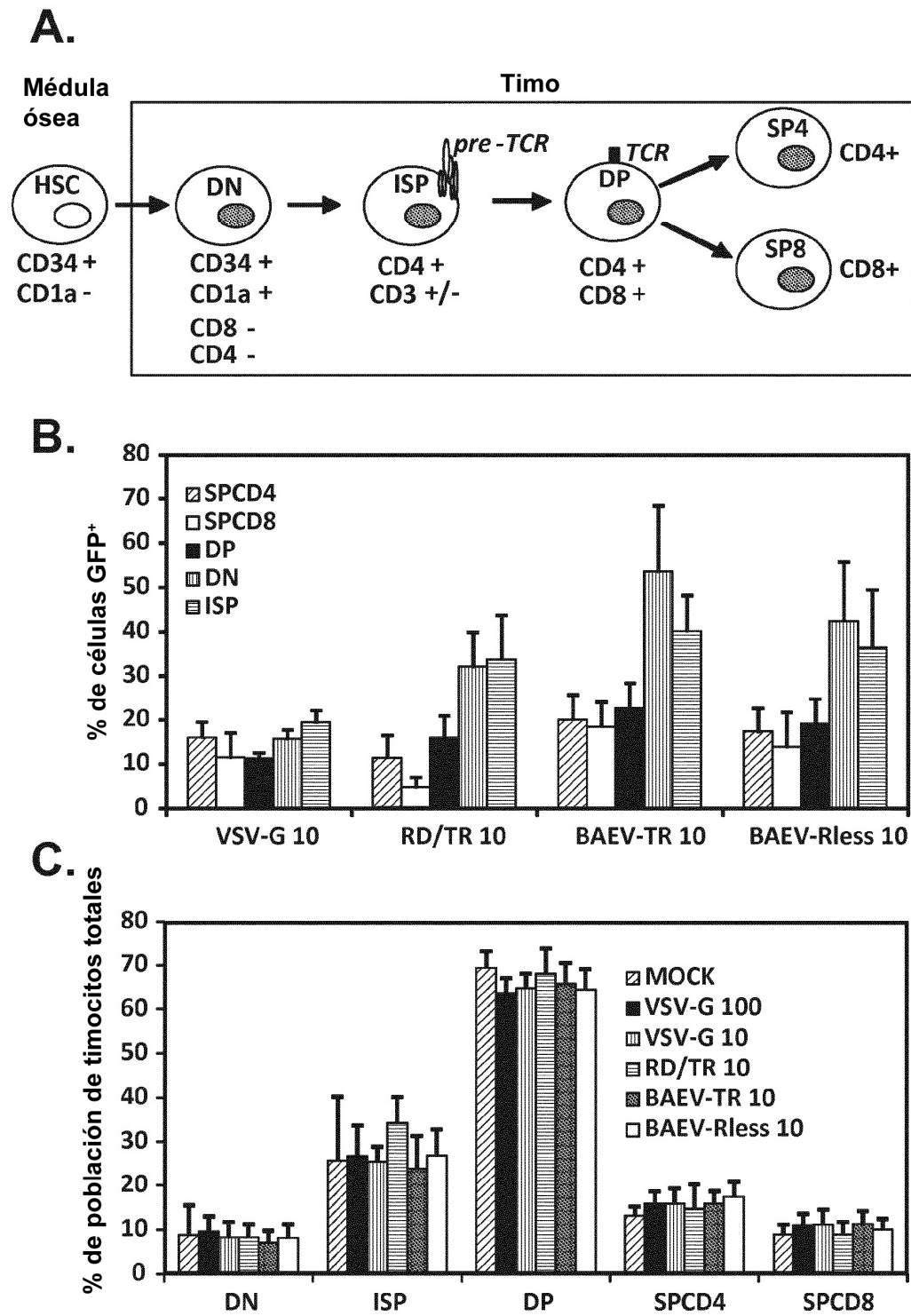


FIG.22

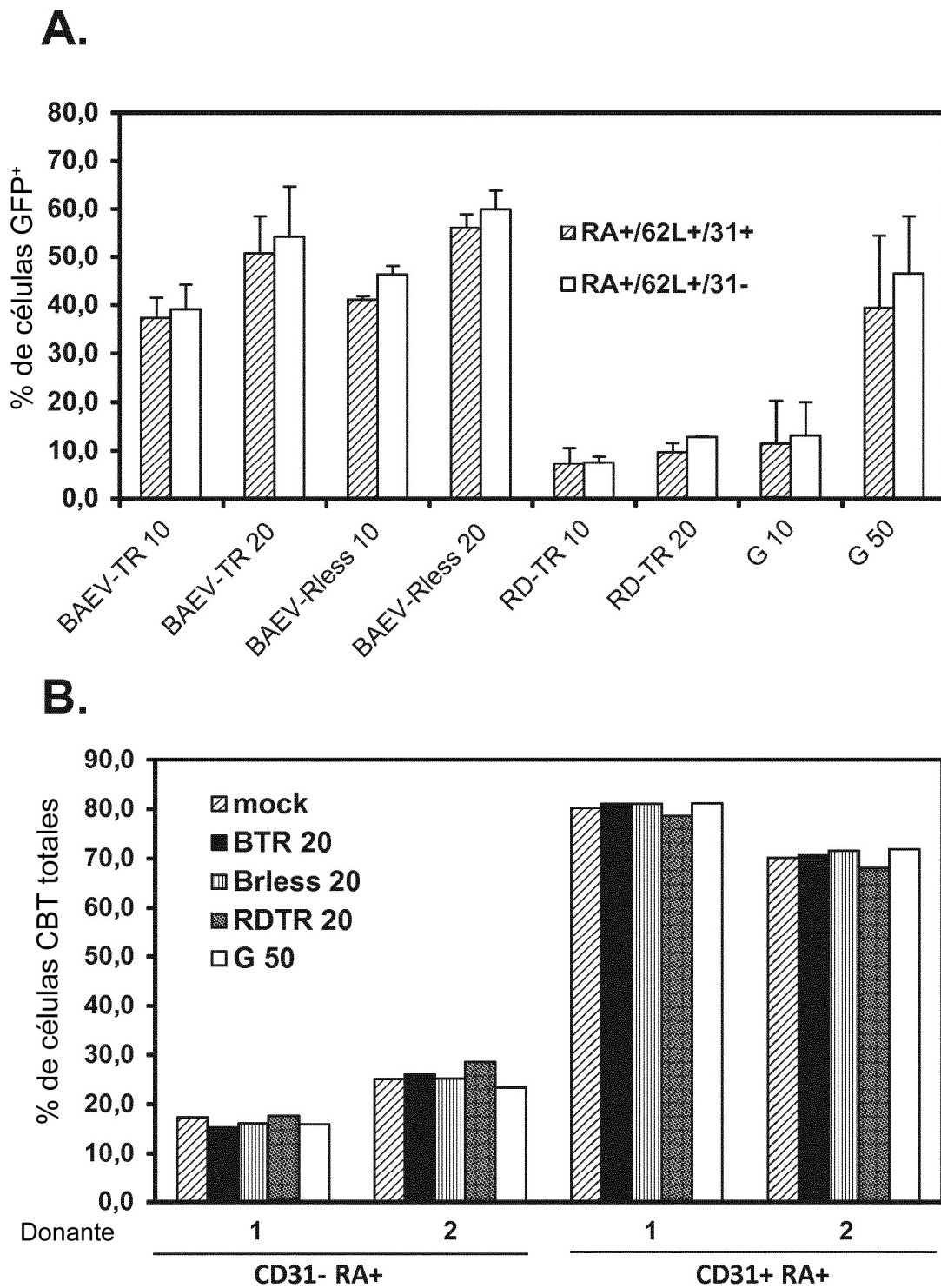


FIG.23