

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 965 292**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/86** (2006.01)

**C07K 16/10** (2006.01)

**A61K 39/29** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.07.2016 PCT/EP2016/066349**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.01.2017 WO17005923**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.07.2016 E 16738128 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.09.2023 EP 3320099**

54 Título: **Vector lentiviral que expresa anticuerpo anclado a membrana o secretado**

30 Prioridad:

**09.07.2015 EP 15306132**

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

**12.04.2024**

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) (25.0%)**

**101, rue de Tolbiac**

**75013 Paris, FR;**

**UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD LYON 1 (25.0%);**

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (25.0%) y**

**ECOLE NORMALE SUPÉRIEURE DE LYON (25.0%)**

72 Inventor/es:

**FUSIL, FLORIANE;**

**VERHOEYEN, ELS;**

**DEFRANCE, THIERRY y**

**COSSET, FRANÇOIS-LOÏC**

74 Agente/Representante:

**PONTI & PARTNERS, S.L.P.**

**Observaciones:**

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

ES 2 965 292 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

Vector lentiviral que expresa anticuerpo anclado a membrana o secretado

5 [0001] La presente invención se refiere a vectores lentivirales que permiten la expresión de anticuerpos secretados y anclados a la membrana por células B.

10 [0002] Las respuestas inmunes adaptativas están mediadas principalmente por dos vías, respuestas de inmunidad celular y humorales. Esta última vía involucra células B y la producción de inmunoglobulinas (Ig). Durante la linfopoyesis de células B, las inmunoglobulinas se expresan inicialmente como una forma anclada a la membrana, el receptor de células B (BCR). La reordenación de los loci de las cadenas pesada y ligera mediante el proceso de recombinación V(D)J permite el ensamblaje de un BCR funcional de isotipos IgM e IgD y su presentación en la superficie celular durante la fase temprana de maduración. Para los antígenos proteicos dependientes de células T, la activación del BCR de membrana en células B vírgenes inicia un proceso de maduración que incluye dos tipos de modificaciones de los genes de Ig: i) introducción de mutaciones puntuales en las regiones variables (hipermutación somática/SHM) que permite la diversificación del repertorio impulsada por Ag y ii) recombinación de cambio de clase de Ig (CSR) que permite que las regiones variables de Ig se asocien con regiones constantes de cadena pesada en dirección 5' del isotipo G, A o E. Tanto CSR como la SHM tienen lugar en su mayor parte en los centros germinales (GC) que se forman en los órganos linfoides secundarios. La reacción de GC conduce a la producción de linfocitos B tanto de memoria como efectores (células plasmáticas). Un mayor encuentro del antígeno (Ag) por parte de las células B de memoria a través de la ligadura al BCR conduce a una rápida expansión clonal y maduración en células plasmáticas, células que están especializadas en la secreción de anticuerpos (Ab). Estas células secretoras de anticuerpos derivadas de la memoria se caracterizan por la producción de Abs de alta afinidad responsables de la mayor eficiencia de la respuesta humoral secundaria. En la última etapa del desarrollo de las células B, las células plasmáticas (PC) producen formas solubles y secretadas de la inmunoglobulina que conserva la misma especificidad e isotipo que el BCR expresado en sus correspondientes progenitores.

25 [0003] Las células B pueden modificarse, ya sea directamente o mediante modificación de células madre hematopoyéticas (HSC) CD34<sup>+</sup> diferenciadas en células B, para producir anticuerpos específicos, que pueden proporcionar enfoques novedosos para estrategias de inmunoterapia activa contra patógenos específicos o células patológicas, tales como células cancerígenas. Sin embargo, la administración continua de IgG secretora, inducida ya sea por transferencia génica o por inmunoterapia pasiva, podría causar, a través de la presión selectiva mediada por Ab, inconvenientes importantes como la inducción de mutantes de virus de escape por Ab neutralizante o células tumorales resistentes.

30 [0004] Por tanto, existe una necesidad importante de nuevas herramientas para la reprogramación de células B que imiten la regulación fisiológica de la producción de Ab, desde el reconocimiento de Ag por las células B hasta la secreción de Ab por las células plasmáticas en el momento adecuado después de la expansión específica de las células que expresan BCR.

35 [0005] El cambio de la forma asociada a membrana a la forma secretada de Igs se controla mediante el procesamiento de ARNm. Esto implica el corte y empalme alternativo y poliadenilación de un único pre-ARNm de Ig que puede producir ambas formas de proteínas Ig (es decir, ancladas a la membrana frente a secretadas), dependiendo del estado de maduración de las células B. En las células B, este pre-ARNm se procesa preferiblemente a un ARNm que codifica la forma anclada a la membrana de Ig (BCR), mientras que las células plasmáticas procesan el mismo pre-ARNm para permitir la producción de la proteína secretada (Abs) reemplazando un ancla transmembrana hidrófoba por una cola C-terminal hidrófila. Además, la diferenciación de las células B en grandes células plasmáticas secretoras de anticuerpos requiere un compromiso total con la síntesis de proteínas mediante la expansión de la vía secretora para formar una red de transporte de endomembranas altamente desarrollada. La compleja red de todos los elementos reguladores mencionados anteriormente es responsable de la expresión condicional estrechamente regulada del BCR frente a la forma secretada de Ig.

40 [0006] La presente invención resulta del desarrollo por parte de los presentes inventores de un nuevo procedimiento para reprogramar células B con construcciones ectópicas que expresan Ab que pueden regular la transición de BCR a Ig secretada de una manera dependiente de la maduración y diferenciación celular.

45 [0007] Más particularmente, los inventores diseñaron un vector lentiviral condicional que codifica el Ab AR3A de neutralización cruzada ampliamente humano dirigido contra la glicoproteína de la envoltura E2 del VHC, describiéndose dicho anticuerpo en Giang et al. (2012) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 109: 6205-6210, en el que dicho vector lentiviral (LV) condicional recapitula la regulación espacio-temporal natural de las formas de IgG1 ancladas a la membrana frente a las secretadas en células B primarias. Este nuevo vector lentiviral condicional permite así la modificación mediada por el LV de las células B humanas, lo que permite la expresión de anticuerpos de neutralización de forma fisiológica.

50 [0008] La presente invención se define en las reivindicaciones.

[0009] Por tanto, la presente invención se refiere a un ácido nucleico multicistrónico, en particular a un ácido nucleico multicistrónico aislado, que comprende:

A) una secuencia que comprende sucesivamente:

A1) una secuencia que codifica el dominio variable de la cadena ligera de un anticuerpo de interés, fusionada en el marco con

A2) una secuencia que codifica la región constante de la cadena ligera de una inmunoglobulina Ig;

y

B) una secuencia que comprende sucesivamente:

B1) una secuencia que codifica el dominio variable de la cadena pesada de dicho anticuerpo de interés, fusionada en el marco con

B2) una secuencia que codifica las regiones constantes de la cadena pesada de una inmunoglobulina Ig' en forma secretora;

B3) una secuencia intrónica del gen de la cadena pesada de dicha inmunoglobulina Ig', consistiendo dicha secuencia intrónica entre 350 y 450 nucleótidos y comprendiendo un sitio de corte y empalme en 5' interno que permite el corte y empalme de dicha secuencia intrónica B3) y una señal de poli(A) específica secretora (pAS) del exón terminal en 3' de dicho gen;

B4) una secuencia, en marco con la secuencia B1), que codifica los dominios transmembrana y citoplasmático M1 y M2 de la inmunoglobulina Ig' BCR, en la que dicha secuencia B4) comprende, entre las secuencias codificantes de los dominios M1 y M2, una secuencia intrónica que contiene un sitio de corte y empalme que permite el corte y empalme de dicha secuencia intrónica entre las secuencias codificantes de los dominios M1 y M2; y

B5) una señal de poli(A) específica anclada a membrana (pAM), después del codón de parada del dominio M2.

en el que el ácido nucleico multicistrónico permite la coexpresión de las secuencias A y B en proteínas separadas y en el que dichas secuencias A y B están unidas mediante una secuencia de enlace que permite la coexpresión de las secuencias A y B en un único ARNm, siendo dicha secuencia de enlace una secuencia del sitio interno de entrada del ribosoma (IRES) viral o una secuencia que codifica polipéptidos 2A, y en el que dicho ácido nucleico multicistrónico comprende antes de dicha secuencia A un promotor específico de células B unido operativamente a dicha secuencia A.

[0010] Este vector lentiviral condicional también se puede usar para hacer que las células B expresen y secreten proteínas condicionalmente efectoras para dirigirse a células o microorganismos que expresan antígenos específicos.

[0011] Por tanto, la presente invención también se refiere a un ácido nucleico, en particular a un ácido nucleico aislado, que codifica una quimera de dominio de unión a antígeno/proteína efectora, comprendiendo dicho ácido nucleico:

A) una secuencia que codifica un dominio de unión a antígeno AbD que interactúa específicamente con un antígeno de interés; y

B) una secuencia que comprende sucesivamente:

B2) una secuencia que codifica una proteína efectora EfP;

B3) una secuencia intrónica del gen de la cadena pesada de una inmunoglobulina Ig', consistiendo dicha secuencia intrónica entre 350 y 450 nucleótidos y comprendiendo un sitio de corte y empalme en 5' interno que permite el corte y empalme de dicha secuencia intrónica B3) y una señal de poli(A) específica secretora (pAS) del exón terminal en 3' de dicho gen;

B4) una secuencia, en marco con la secuencia B2), que codifica los dominios transmembrana y citoplasmático M1 y M2 de la inmunoglobulina Ig' BCR, en la que dicha secuencia B4) comprende, entre las secuencias codificantes de los dominios M1 y M2, una secuencia intrónica que contiene un sitio de corte y empalme que permite el corte y empalme de dicha secuencia intrónica entre las secuencias codificantes M1 y M2; y

B5) una señal de poli(A) específica anclada a membrana (pAM), después del codón de parada del dominio M2.

en el que el ácido nucleico permite la expresión de las secuencias A y B en una única proteína, en el que dicho ácido nucleico comprende antes de dicha secuencia A un promotor específico de células B unido operativamente a dicha secuencia A.

[0012] En el caso en que el dominio de unión al antígeno AbD y/o la proteína efectora estén formados por dos subunidades, la presente invención también se refiere a un ácido nucleico multicistrónico, en particular un ácido nucleico multicistrónico aislado, que codifica una quimera de un dominio de unión a antígeno/proteína efectora, comprendiendo dicho ácido nucleico:

A) una secuencia que comprende sucesivamente:

A1) una secuencia que codifica una primera subunidad AbD1 de un dominio de unión a antígeno AbD, fusionada en el marco con

A2) una primera subunidad EfP1 de una proteína efectora EfP, u opcionalmente una secuencia que codifica una proteína efectora EfP;

y B) una secuencia que comprende sucesivamente:

B1) una secuencia que codifica una segunda subunidad AbD2 del dominio de unión a antígeno AbD, formando AbD2 en combinación con AbD1 un dominio de unión a antígeno que interactúa específicamente con un antígeno de interés, estando dicha secuencia B1 fusionada en el marco con

B2) una secuencia que codifica una segunda subunidad EfP2 de la proteína efectora EfP o una secuencia que

codifica la proteína efectora EfP;

B3) una secuencia intrónica del gen de la cadena pesada de una inmunoglobulina Ig', consistiendo dicha secuencia intrónica entre 350 y 450 nucleótidos y comprendiendo un sitio de corte y empalme en 5' interno que permite el corte y empalme de dicha secuencia intrónica B3) y una señal de poli(A) específica secretora (pAS) del exón terminal en 3' de dicho gen;

B4) una secuencia, en marco con la secuencia B1), que codifica los dominios transmembrana y citoplasmático M1 y M2 de la inmunoglobulina Ig' BCR, en la que dicha secuencia B4) comprende, entre las secuencias codificantes de los dominios M1 y M2, una secuencia intrónica que contiene un sitio de corte y empalme que permite el corte y empalme de dicha secuencia intrónica entre las secuencias codificantes M1 y M2; y

B5) una señal de poli(A) específica anclada a membrana (pAM), después del codón de parada del dominio M2.

en el que el ácido nucleico multicistrónico permite la coexpresión de las secuencias A y B en proteínas separadas y en el que dichas secuencias A y B están unidas mediante una secuencia de enlace que permite la coexpresión de las secuencias A y B en un único ARNm, siendo dicha secuencia de enlace una secuencia del sitio interno de entrada del ribosoma (IRES) viral o una secuencia que codifica polipéptidos 2A, y en el que dicho ácido nucleico multicistrónico comprende antes de dicha secuencia A un promotor específico de células B unido operativamente a dicha secuencia A.

### Descripción detallada de la invención

#### Definiciones

[0013] En el contexto de la invención, el término "ácido nucleico" se refiere a polinucleótidos, tales como ácido desoxirribonucleico (ADN) y, cuando sea apropiado, ácido ribonucleico (ARN). Preferiblemente, el ácido nucleico de la invención es ADN. También debe entenderse que el término incluye, como equivalentes, análogos de ARN o ADN producidos a partir de análogos de nucleótidos.

[0014] El término "ácido nucleico aislado", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un ácido nucleico que está (i) libre de secuencias que normalmente flanquean uno o ambos lados del ácido nucleico en un genoma, (ii) incorporado en un vector o en el ADN genómico de un organismo de modo que la molécula resultante no sea idéntica a ningún vector o ADN genómico de origen natural, o (iii) un ADNc, un fragmento de ácido nucleico genómico, un fragmento producido mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o un fragmento de restricción. Además, un ácido nucleico aislado puede incluir un ácido nucleico modificado, tal como una molécula de ADN recombinante que forma parte de un ácido nucleico híbrido o de fusión.

[0015] El ácido nucleico de la invención puede comprender secuencias codificantes y/o no codificantes. Los ácidos nucleicos codificantes tienen secuencias de nucleótidos que se transcriben en moléculas de ARN que pueden traducirse para crear polipéptidos. Los ácidos nucleicos no codificantes, normalmente, se transcriben en ARN que no se pueden traducir.

[0016] En el contexto de la invención, el término "ácido nucleico multicistrónico" se refiere a un ácido nucleico, tal como se define anteriormente, que comprende al menos dos cistrones.

[0017] Todas las secuencias de ácidos nucleicos definidas en la presente solicitud pueden optimizarse en codones. Los procedimientos de optimización de codones son conocidos en la técnica y pueden ser útiles en esfuerzos para lograr uno o más de varios objetivos. Estos objetivos incluyen hacer coincidir las frecuencias de codones en los organismos diana y huésped para garantizar un plegamiento adecuado, sesgar el contenido de GC para aumentar la estabilidad del ARNm o reducir las estructuras secundarias, minimizar los codones repetidos en tándem o las corridas de bases que pueden afectar la construcción o expresión de genes, personalizar las regiones de control transcripcional y traduccional, insertar o eliminar secuencias de tráfico de proteínas, eliminar/agregar sitios de modificación postraduccional en proteínas codificadas (por ejemplo, sitios de glicosilación), agregar, eliminar o mezclar dominios de proteínas, insertar o eliminar sitios de restricción, modificar sitios de unión a ribosomas y sitios de degradación de ARNm, para ajustar los índices de traducción para permitir que los diversos dominios de la proteína se plieguen adecuadamente, o para reducir o eliminar estructuras secundarias problemáticas dentro del ARNm, o para evitar sitios de empalme crípticos, tal como se describe en Fallot et al. (2009) *Nucleic Acids Res.* 37:e134 o Resse et al. (1997) *J. Comput. Biol.* 4:311-323. Las herramientas, algoritmos y servicios de optimización de codones son conocidos en la técnica, incluyendo entre los ejemplos no limitantes servicios de GeneArt (Life Technologies), DNA2.0 (Menlo Park California) y/o procedimientos patentados. Las opciones de codones para cada aminoácido se indican en la Tabla 1.

Tabla 1: Opciones de codones

Aminoácido	Código de una letra	Opciones de codones
Isoleucina	I	ATT, ATC, ATA
Leucina	L	CTT, CTC, CTA, CTG, TTA, TTG
Valina	V	GTT, GTC, GTA, GTG
Fenilalanina	F	TTT, TTC

Metionina	M	ATG
Cisteína	C	TGT, TGC
Alanina	A	GCT, GCC, GCA, GCG
Glicina	G	GGT, GGC, GGA, GGG
Prolina	P	CCT, CCC, CCA, CCG
Treonina	T	ACT, ACC, ACA, ACG
Serina	S	TCT, TCC, TCA, TCG, AGT, AGC
Tirosina	Y	TAT, TAC
Triptófano	W	TGG
Glutamina	Q	CAA, CAG
Asparagina	N	AAT, AAC
Histidina	H	CAT, CAC
Ácido glutámico	E	GAA, GAG
Ácido aspártico	D	GAT, GAC
Lisina	K	AAA, AAG
Arginina	R	CGT, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG
Codones de parada	Parada	TAA, TAG, TGA

[0018] Por "una secuencia al menos x% idéntica a una secuencia de referencia", se pretende que la secuencia difiere de la secuencia de referencia en hasta 100-x alteraciones de aminoácidos, respectivamente nucleótidos, por cada 100 aminoácidos, respectivamente nucleótidos, de la secuencia de referencia.

5 [0019] La alineación y la determinación del porcentaje de identidad se pueden llevar a cabo de forma manual o automática usando, por ejemplo, el programa Needle que se basa en el algoritmo de Needleman y Wunsch, descrito en Needleman y Wunsch (1970) J. Mol Biol. 48: 443-453, con, por ejemplo, los siguientes parámetros para la comparación de secuencias de polipéptidos: matriz de comparación: BLOSUM62, penalización por apertura de espacio: 10 y penalización por extensión de espacio: 0,5, penalización por espacio final: falso, penalización por apertura de espacio final = 10, penalización por extensión de espacio final = 0,5; y los siguientes parámetros para la comparación de secuencias de polinucleótidos: matriz de comparación: DNAFULL; penalización por apertura del espacio = 10, penalización por extensión del espacio = 0,5, penalización por el espacio final: falso, penalización por apertura del espacio final = 10, penalización por extensión del espacio final = 0,5.

15 [0020] En el contexto de la invención, el término "inmunoglobulina" se refiere a proteínas de la superfamilia de inmunoglobulinas, preferiblemente a receptores de antígenos, tales como anticuerpos o el receptor de células B (BCR). Las inmunoglobulinas se caracterizan por un dominio estructural, es decir, el dominio de inmunoglobulina, que tiene un pliegue de inmunoglobulina (Ig) característico. El término abarca tanto las inmunoglobulinas ancladas a la membrana, así como las inmunoglobulinas secretoras. Las inmunoglobulinas ancladas o unidas a membranas también se denominan inmunoglobulinas de superficie o inmunoglobulinas de membrana, que generalmente forman parte del BCR.

25 [0021] Las inmunoglobulinas generalmente comprenden varias cadenas, habitualmente dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas que están unidas mediante enlaces disulfuro. Estas cadenas están compuestas principalmente por dominios de inmunoglobulina, incluido el dominio V<sub>L</sub> (dominio variable de cadena ligera), el dominio C<sub>L</sub> (dominio constante de cadena ligera), el dominio V<sub>H</sub> (dominio variable de cadena pesada) y los dominios C<sub>H</sub> (dominios constantes de cadena pesada) C<sub>H</sub>1, opcionalmente una región bisagra, C<sub>H</sub>2, C<sub>H</sub>3 y opcionalmente C<sub>H</sub>4.

30 [0022] Hay cinco clases principales de cadenas pesadas (o isotipos) que determinan la actividad funcional de una molécula de anticuerpo: mu (μ) para IgM, delta (δ) para IgD, gamma (γ) para IgG, alfa (α) para IgA y épsilon (ε) para IgE. En el contexto de la invención, la inmunoglobulina puede ser una IgM, IgD, IgG, IgA o IgE. Preferiblemente, la inmunoglobulina es una IgG. Como es conocido por el experto, el isotipo IgG abarca cuatro subclases: las subclases IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. En el contexto de la invención, la inmunoglobulina puede ser de cualquier subclase de IgG. Preferiblemente, la inmunoglobulina es una IgG1. A diferencia de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas secretoras, las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas ancladas a la membrana comprenden un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático corto en su extremo carboxilo.

40 [0023] En los mamíferos, existen dos tipos de cadena ligera, lambda (λ) y kappa (κ). Ambos tipos de cadenas ligeras pueden asociarse indistintamente con cualquier clase de cadena pesada.

45 [0024] Las cadenas de inmunoglobulina comprenden una región variable y una región constante. La región constante se conserva esencialmente en los diferentes isotipos de las inmunoglobulinas, en las que la parte variable es muy diversa.

[0025] Las regiones variables de las cadenas ligera (V<sub>L</sub>) y pesada (V<sub>H</sub>) determinan el reconocimiento de unión y la especificidad del antígeno. Las regiones V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> se pueden subdividir en regiones de hipervariabilidad, denominadas

regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones estructurales (FR). Cada  $V_H$  y  $V_L$  está compuesto por tres CDR y cuatro FR, dispuestos desde el extremo amino al extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

5 [0026] Los dominios de la región constante de las cadenas ligera ( $C_L$ ) y pesada ( $C_H$ ) confieren propiedades biológicas importantes, tales como asociación de cadenas de anticuerpos, secreción, movilidad transplacentaria, unión al complemento y unión a receptores Fc (FcR).

10 [0027] Como se usa en el presente documento, el término "regiones constantes de una cadena pesada de inmunoglobulina" se refiere preferiblemente a las regiones de la cadena pesada de inmunoglobulina compuesta por  $C_{H1}$ , opcionalmente una región bisagra,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$  y opcionalmente el dominio  $C_{H4}$ , que comprende preferiblemente una o más, preferiblemente todas, las potenciales regiones enlazadoras y/o bisagra. Se prefiere particularmente que la región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina comprenda uno o más residuos de cisteína que sean capaces de mediar la asociación con otra región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina mediante enlaces disulfuro.

15 [0028] Como se usa en el presente documento, el término "receptor de células B" o "BCR" se refiere al receptor de antígeno en la membrana plasmática de las células B. El receptor de células B generalmente está compuesto por un anticuerpo anclado a la membrana, tal como se define anteriormente, asociado con heterodímeros de Ig- $\alpha$  e Ig- $\beta$  que son capaces de transducir señales.

20 [0029] Como se usa en el presente documento, el término "dominio transmembrana y citoplasmático de un receptor de células B" se refiere preferiblemente al dominio transmembrana de la parte de inmunoglobulina anclada a la membrana del receptor de células B, es decir, el dominio transmembrana y citoplasmático de la cadena pesada de inmunoglobulina anclada a membrana.

25 [0030] Como es conocido por el experto, los dominios transmembrana y citoplasmático M1 y M2 de una cadena pesada de inmunoglobulina anclada a la membrana son importantes para el anclaje y la señalización del BCR después de la estimulación antigénica, ya que contienen una secuencia transmembrana y un dominio citosólico que se asocian con otros componentes del BCR en la superficie celular para promover la transducción de señales.

30 [0031] Por "anticuerpo de interés" se entiende en el presente documento una inmunoglobulina, tal como se define anteriormente, que comprende un dominio variable de cadena ligera y un dominio variable de cadena pesada que determinan su especificidad antigénica, y un dominio constante de cadena ligera y dominios constantes de cadena pesada, y que está destinado a ser producido por una célula. Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos del anticuerpo de interés y/o la secuencia codificante del anticuerpo de interés y/o la secuencia del gen que codifica el anticuerpo de interés son conocidas o pueden ser determinadas por el experto.

35 [0032] El anticuerpo de interés es preferiblemente un anticuerpo monoclonal. El anticuerpo de interés también puede ser un anticuerpo quimérico.

40 [0033] Un anticuerpo "quimérico" se refiere a un anticuerpo formado por componentes de al menos dos fuentes diferentes. En determinadas realizaciones, un anticuerpo quimérico comprende una parte de un anticuerpo derivado de una primera especie fusionada a otra molécula, por ejemplo, una parte de un anticuerpo derivado de una segunda especie. En determinadas realizaciones de este tipo, un anticuerpo quimérico comprende una parte de un anticuerpo derivado de un animal no humano fusionada a una parte de un anticuerpo derivado de un ser humano. En determinadas realizaciones de este tipo, un anticuerpo quimérico comprende toda o una parte de una región variable de un anticuerpo derivado de un animal no humano fusionada a una región constante de un anticuerpo derivado de un ser humano.

45 [0034] En particular, el anticuerpo de interés puede ser un anticuerpo humanizado. Un anticuerpo "humanizado" se refiere a un anticuerpo no humano que ha sido modificado para que coincida más estrechamente (en la secuencia de aminoácidos) con un anticuerpo humano. En determinadas realizaciones, se modifican los residuos de aminoácidos fuera de los residuos de unión al antígeno de la región variable del anticuerpo no humano. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región hipervariable del receptor se reemplazan por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano, que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En determinadas realizaciones, un anticuerpo humanizado se construye reemplazando toda o una parte de una CDR de un anticuerpo humano por toda o una parte de una CDR de otro anticuerpo, tal como un anticuerpo no humano, que tiene la especificidad de unión al antígeno deseada. En determinadas realizaciones, un anticuerpo humanizado comprende regiones variables en las que todas o sustancialmente todas las CDR corresponden a CDR de un anticuerpo no humano y todas o sustancialmente todas las regiones estructurales (FR) corresponden a FR de un anticuerpo humano. En determinadas realizaciones de este tipo, un anticuerpo humanizado comprende además una región constante (Fc) de un anticuerpo humano. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo donante.

[0035] El anticuerpo de interés puede ser además un anticuerpo humano.

[0036] El término "anticuerpo humano" se refiere a un anticuerpo monoclonal que contiene secuencias de anticuerpos humanos y no contiene secuencias de anticuerpos de un animal no humano. En determinadas realizaciones, un anticuerpo humano puede contener secuencias sintéticas que no se encuentran en los anticuerpos nativos. El término no está limitado por la manera en que se producen los anticuerpos. Por ejemplo, en diversas realizaciones, se puede producir un anticuerpo humano en un ratón transgénico, mediante presentación en fagos, mediante linfocitos B humanos o mediante procedimientos recombinantes.

[0037] Como se usa en el presente documento, el término "secuencia intrónica" o "intrón" se refiere a cualquier secuencia de nucleótidos dentro de un gen que se elimina mediante corte y empalme de ARN durante la maduración del producto de ARN final. El corte y empalme alternativo de intrones dentro de un gen actúa para introducir una mayor variabilidad de las secuencias de proteínas traducidas de un solo gen, lo que permite generar múltiples proteínas relacionadas a partir de un solo gen y un único transcrito de ARNm precursor. El control del corte y empalme alternativo del ARN se realiza mediante una compleja red de moléculas de señalización que responden a una amplia gama de señales intracelulares y extracelulares. Los intrones contienen varias secuencias cortas que son importantes para un corte y empalme eficiente, tales como sitios aceptores y donantes en cualquier extremo del intrón, así como secuencias potenciadoras o silenciadoras del corte y empalme, o un sitio de punto de ramificación, que son necesarios para el corte y empalme adecuado por parte del espliceosoma.

[0038] Las secuencias intrónicas de genes que codifican cadenas pesadas de inmunoglobulina son bien conocidas o pueden ser identificadas por el experto. Para todos los genes que codifican cadenas pesadas de inmunoglobulina, hay un exón en la región constante que se corta y empalma en un sitio de corte y empalme en 5' interno o se escinde y poliadenila en la señal de poli(A) específica secretora (pAS). Cuando el pre-ARNm se escinde en el pAS, el ARNm codifica la inmunoglobulina secretora. Cuando el pre-ARNm se corta y empalma a uno o dos exones en dirección 3' y se utiliza la señal de poli(A) en dirección 3' (pAM o poli(A) específica anclado a la membrana), el ARNm codifica la inmunoglobulina anclada a la membrana. Más específicamente, la señal de pAS está preferiblemente aproximadamente entre 100 y 150 nucleótidos en dirección 3' del último exón de la región constante que codifica el extremo 3' del ARNm específico secretor.

[0039] El extremo 3' del ARNm específico anclado a la membrana está codificado por una gran parte de la última región constante y por dos exones en dirección 3', M1 y M2. El ARNm específico anclado a la membrana se produce cuando el corte y empalme del último exón de la región constante a M1 tiene lugar utilizando el sitio de corte y empalme en 5' interno dentro del último exón de la región constante, la poliadenilación se produce en el sitio pAM al final de M2, y preferiblemente también se corta y empalma la secuencia intrónica entre los exones M1 y M2.

[0040] Como es conocido por el experto, la secuencia señal de poli(A) central altamente conservada 5'-AAUAAA-3' normalmente está incluida en una región rica en AU (28 de 29 nucleótidos que rodean AAUAAA son A o U) que mejora el uso de la señal de pAS. La señal de pAS contiene preferiblemente dos secuencias ricas en GU en dirección 3' que están ubicadas en 1 y 38 nucleótidos del sitio de escisión.

[0041] Como es conocido por el experto, los sitios de corte y empalme comprenden un sitio donante (en el extremo 5' del intrón) y un sitio aceptor (en el extremo 3' del intrón). El sitio donante de corte y empalme incluye preferiblemente una secuencia de GU casi invariante en el extremo 5' del intrón, dentro de una región más grande y menos altamente conservada. El sitio aceptor de corte y empalme en el extremo 3' del intrón termina el intrón preferiblemente con una secuencia de AG casi invariante. En dirección 5' del AG se encuentra preferiblemente un tracto de polipirimidina (región rica en C y U), en dirección 5' de la cual se encuentra el punto de ramificación, que incluye preferiblemente un nucleótido de adenina. Por lo tanto, la secuencia consenso para un intrón es habitualmente: AG-[corte]-GURAGU (sitio donante)... secuencia del intrón... YURAC (secuencia de ramificación de 20-50 nucleótidos en dirección 5' del sitio aceptor)... Y-rica-NCAG-[corte]-G (sitio aceptor).

[0042] Como quedará claro para el experto, las secuencias mencionadas en el presente documento que están implicadas en el corte y empalme del ARNm desempeñan un papel en la etapa del ARNm. En consecuencia, pueden denominarse indistintamente secuencias de ADN (con nucleótidos A, T, C o G) o secuencias de ARN (con nucleótidos A, U, C o G).

[0043] En el contexto de la invención, el término "dominio de unión a antígeno" se refiere a cualquier péptido, polipéptido, molécula de tipo armazón, molécula de expresión peptídica o construcción que contiene polipéptido que sea capaz de unirse específicamente a un antígeno particular de interés. Los dominios de unión a antígeno incluyen, por ejemplo, partes de anticuerpos que se unen a antígeno, anticuerpos monocatenarios, anticuerpos de dominio único (por ejemplo, anticuerpos VHH de animales camélidos), péptidos que interactúan específicamente con un antígeno particular (por ejemplo, peptidocuerpos), moléculas receptoras que interactúan específicamente con un antígeno particular, proteínas que comprenden una parte de unión a ligando de un receptor que se une específicamente a un antígeno particular, armazones de unión a antígeno (por ejemplo, DARPs, proteínas repetidas HEAT, proteínas repetidas ARM, proteínas repetidas tetratricopeptídicas y otros armazones basados en proteínas repetidas naturales), y aptámeros o partes de los mismos.

[0044] El dominio de unión al antígeno puede estar formado por un único péptido o proteína AbD, o por la combinación de dos subunidades del dominio de unión al antígeno, AbD1 y AbD2, permitiendo la combinación de estas dos subunidades la interacción específica del dominio de unión a antígeno global con un antígeno de interés.

5 [0045] En el contexto de la invención, el término "proteína efectora" se refiere a una proteína que está implicada en la regulación de una vía de señalización biológica. Preferiblemente, la proteína efectora es una proteína efectora inmune o una proteína efectora que induce la muerte celular.

10 [0046] Por "proteína efectora inmunitaria" se entiende en el presente documento una proteína que está implicada en la regulación de una vía del sistema inmunitario. Ejemplos de proteínas efectoras inmunes incluyen citocinas.

[0047] Por "proteína efectora inductora de muerte celular" se entiende en el presente documento una proteína que está implicada en la vía de señalización de la muerte celular, en particular en la vía de señalización de la apoptosis.

15 [0048] La proteína efectora puede estar formada por un único péptido o proteína EfP, o por la combinación de dos subunidades de proteína efectora, EfP1 y EfP2, formando la combinación de estas dos subunidades una proteína efectora activa EfP.

20 [0049] Por "combinación" se entiende en el presente documento cualquier interacción que una dos subunidades definidas anteriormente, tal como un enlace disulfuro.

[0050] Como se usa en el presente documento, el término "célula B" se refiere a un linfocito B. Los precursores de células B residen en la médula ósea donde se producen las células B inmaduras. Muy brevemente, el desarrollo de las células B tiene lugar a través de varias etapas, representando cada etapa un cambio en el contenido del genoma en los loci del anticuerpo. En la región variable de la cadena pesada genómica, hay tres segmentos, V, D y J, que se recombinan aleatoriamente, en un proceso llamado reordenamiento VDJ para producir una región variable única en la inmunoglobulina de cada célula B. Se producen reordenamientos similares para la región variable de la cadena ligera, excepto que solo hay dos segmentos involucrados, V y J. Después del reordenamiento completo, la célula B alcanza la etapa inmadura de IgM<sup>+</sup> en la médula ósea. Estas células B inmaduras presentan una IgM anclada a la membrana, es decir, BCR, en su superficie y migran al bazo, donde se denominan células B de transición. Algunas de estas células se diferencian en linfocitos B maduros. Las células B maduras que expresan el BCR en su superficie circulan por la sangre y el sistema linfático desempeñando la función de vigilancia inmunitaria. No producen inmunoglobulinas secretoras hasta que se activan por completo. Cada célula B tiene una proteína receptora única que se unirá a un antígeno en particular. Una vez que una célula B encuentra su antígeno y recibe una señal adicional de una célula T auxiliar, puede diferenciarse aún más en una célula B plasmática que expresa y secreta inmunoglobulinas secretoras o una célula B de memoria.

40 *Ácido nucleico multicistrónico*

[0051] Los presentes inventores diseñaron un ácido nucleico multicistrónico específico que codifica un anticuerpo de interés capaz de:

- impulsar la coexpresión de las secuencias que codifican respectivamente las cadenas ligera y pesada de este anticuerpo de interés en proteínas separadas, e
- 45 - impulsar la expresión de una forma anclada a la membrana y/o una forma secretada de dicho anticuerpo de interés dependiendo de la etapa de maduración de la célula B en la que se incorporó.

[0052] Preferiblemente, el ácido nucleico multicistrónico de la invención comprende o consiste en al menos 1000 nucleótidos, más preferiblemente, al menos 2000 nucleótidos, 2500, 3000, 3500, 3600, 3700, 3800, 3900, 4000, 4100 o al menos 4180 nucleótidos.

50 ***Coexpresión de las secuencias A y B.***

[0053] El ácido nucleico multicistrónico según la invención permite la coexpresión de las secuencias A y B que lo contiene en proteínas separadas.

[0054] En particular, las secuencias A y B pueden expresarse en proteínas separadas mediante la producción de ARNm separados o mediante la producción de un ARNm único.

60 [0055] Cuando las secuencias A y B se expresan en proteínas separadas mediante la producción de ARNm separados, estas secuencias A y B están preferiblemente bajo el control de diferentes promotores o bajo el control de un promotor bidireccional único, tal como una combinación bidireccional de una secuencia sintética compuesta por el promotor mínimo de CMV asociado con un promotor/potenciador fuerte específico de células B (B29 o FEEK).

65 [0056] En una realización preferida, las secuencias A y B se expresan en proteínas separadas mediante la producción de un ARNm único. Más preferiblemente, dichas secuencias A y B se unen mediante una secuencia de enlace que

permite la coexpresión de las secuencias A y B en un ARNm único.

[0057] Tales secuencias de enlace son bien conocidas por el experto y se describen, por ejemplo, en Chan et al. (2011) PLoS One 6:e28885. Ejemplos de secuencias de enlace que permiten la coexpresión de dos secuencias en un ARNm único incluyen secuencias del sitio de entrada al ribosoma interno viral (IRES) y secuencias que codifican oligopéptidos 2A.

[0058] En una realización preferida, dichas secuencias A y B se unen por una secuencia que codifica un oligopéptido 2A.

[0059] Se identificaron "oligopéptidos 2A", "péptidos 2A" o "CHYSEL" en el Virus de la Fiebre Aftosa (FMDV) y posteriormente en otros géneros de *Picornaviridae*. Estos péptidos "autoescinden" sus poliproteínas primarias 2A/2B mediante un mecanismo de "salto" ribosómico que implica la inhibición de la formación de enlaces peptídicos entre el residuo de glicina C-terminal del péptido 2A y el residuo de prolina N-terminal del péptido 2B. Estos péptidos comparten un motivo de consenso -DxExNPG↓P- (SEQ ID NO: 1) para la función de "salto", donde ↓ representa la posición de "salto". Los ejemplos de péptidos 2A incluyen el péptido F2A del FMDV, el péptido T2A del virus de *Thesea asigna*, el péptido P2A del teschovirus-1 porcino y el péptido E2A del virus A de la rinitis equina, describiéndose estos péptidos habitualmente en Szymczak et al. (2004) Nature Biotech. 22:589-594.

[0060] El péptido F2A normalmente consiste en la secuencia VKQTLNFDLKLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO: 2). El péptido F2A normalmente está codificado por la secuencia de nucleótidos 5'-gtg aaa cag act ttg aat ttt gac ctt etc aag ttg gca gga gac gtt gag tcc aac cct ggg ccc -3' (SEQ ID NO: 3). El péptido T2A normalmente consiste en la secuencia EGRGSLTTCGDVEENPGP (SEQ ID NO: 4). El péptido T2A normalmente está codificado por la secuencia de nucleótidos 5'-ggc agg gga agt ctt cta aca tgc ggg gac gtg gag gaa aat ccc ggc ccc-3' (SEQ ID NO: 5). El péptido P2A normalmente consiste en la secuencia ATNFSLKQAGDVESNPGP (SEQ ID NO: 6). El péptido P2A normalmente está codificado por la secuencia de nucleótidos 5'-gcc aca aac ttt tct tta cta aaa caa gcg gga gat gtt gag gaa aac ccc ggg cct-3' (SEQ ID NO: 7). E2A normalmente consiste en la secuencia QCTNYALLKLAGDVESNPGP (SEQ ID NO: 8). El péptido E2A normalmente está codificado por la secuencia de nucleótidos 5'-cag tgt act aac tat get ttg ttg aaa tta get ggg gat gtt gag agc aac ccc ggc cct-3' (SEQ ID NO: 9).

[0061] Preferiblemente dichas secuencias A y B están unidas por una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido 2A que consiste en una secuencia al menos 80% idéntica, más preferiblemente al menos 90%, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9 idéntica o 100% idéntica a la secuencia ID NO: 2, 4, 6 u 8, siempre que dicho péptido 2A conserve la propiedad de "salto" definida anteriormente.

[0062] Aún preferiblemente, dichas secuencias A y B están unidas por una secuencia de nucleótidos al menos 80% idéntica, más preferiblemente al menos 90%, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9 idéntica. o 100% idéntica a la secuencia SEQ ID NO: 3, 5, 7 o 9, siempre que el péptido que codifica esta secuencia de nucleótidos conserve la propiedad de "salto" definida anteriormente.

[0063] Preferiblemente, dichas secuencias A y B están unidas por una secuencia de nucleótidos que codifica el péptido 2A del FMDV, tal como se define anteriormente.

[0064] Las secuencias optimizadas de codones de las secuencias que codifican estos péptidos 2A son conocidas por el experto y se describen, por ejemplo, en Szymczak et al. (2004) Nature Biotech. 22:589-594. Una secuencia optimizada de codones de la secuencia que codifica el péptido F2A es habitualmente la secuencia 5'-gtg aaa cag act ttg aat ttt gac ctt etc aag ttg gcg gga gac gtg gag tcc aac cca ggg ccc-3' (SEQ ID NO: 10). Una secuencia optimizada de codones de la secuencia que codifica el péptido T2A es habitualmente la secuencia 5'-gag ggc aga gga agt ctg cta aca tgc ggt gac gtc gag gag aat cct ggc cca-3' (SEQ ID NO: 11). Una secuencia optimizada de codones de la secuencia que codifica el péptido E2A es habitualmente la secuencia 5'-caa tgt act aac tac get ttg ttg aaa etc get ggc gat gtt gaa agt aac ccc ggt cct-3' (SEQ ID NO: 12).

[0065] Preferiblemente, dichas secuencias A y B están unidas por una secuencia de nucleótidos con codones optimizados del péptido 2A seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 10, 11 y 12.

[0066] Preferiblemente, dichas secuencias A y B están unidas por una secuencia de nucleótidos con codones optimizados que codifica el péptido 2A de FMDV, en particular la secuencia SEQ ID NO: 10, tal como se describe por ejemplo en Yu et al. (2012) PLoS One 7:e50438.

[0067] Es particularmente útil incluir una secuencia que codifica un sitio de escisión por furina antes de la secuencia que codifica el péptido 2A. De hecho, dicho sitio de escisión por furina permite retirar el péptido 2A residual, tal como se describe en Fang et al. (2005) Nat. Biotech. 23:584-590.

[0068] Por consiguiente, en una realización particular, dichas secuencias A y B están unidas por una secuencia de nucleótidos que incluye una secuencia que codifica un sitio de escisión por furina y una secuencia, preferiblemente una secuencia de nucleótidos con codones optimizados, que codifica un péptido 2A, preferiblemente el péptido 2<sup>a</sup> de

FMDV.

5 [0069] Los sitios de escisión por furina son bien conocidos por los expertos y, por ejemplo, se describen en Fang et al. (2005) Nat. Biotechnol. 23:584-590 y Fang et al. (2007) Mol. Therapy 15:1153-1159. Un sitio de escisión por furina normalmente consiste en la secuencia consenso RXK/RR (SEQ ID NO: 13). Preferiblemente, el sitio de escisión por furina consiste en la secuencia RAKR (SEQ ID NO: 14). Dicho sitio de escisión por furina normalmente está codificado por la secuencia de nucleótidos 5'-cgggctaagaga-3' (SEQ ID NO: 15).

10 [0070] En la realización particular en la que el ácido nucleico codifica una quimera de dominio de unión a antígeno/proteína efectora formada por subunidades individuales y en la que el ácido nucleico permite así la expresión de las secuencias A y B en una única proteína, las secuencias A y B están unidas preferiblemente por una secuencia que codifica un enlazador proteico que puede ser escindible o no.

15 [0071] Un promotor específico de células B está operativamente unido a la secuencia A definida anteriormente. Por consiguiente, el ácido nucleico multicistrónico de la invención comprende además, antes de dicha secuencia A, un promotor específico de células B unido operativamente a dicha secuencia A.

20 [0072] Como se usa en el presente documento, el término "unido operativamente" se usa para describir la conexión entre elementos reguladores y un gen o su región codificante. Es decir, la expresión génica normalmente se coloca bajo el control de ciertos elementos reguladores, por ejemplo promotores constitutivos o inducibles, elementos reguladores específicos de tejido y potenciadores. Se dice que un gen o región codificante está "unido operativamente a" o "asociado operativamente a" los elementos reguladores, lo que significa que el gen o la región codificante está controlada o influenciada por el elemento regulador.

25 [0073] En el contexto de la invención, el término "promotor específico de células B" se refiere a cualquier secuencia promotora/potenciadora que sea capaz de dirigir la expresión transgénica específica en células B. Por ejemplo, un promotor específico de células B puede ser capaz de dirigir la expresión transgénica en células B, plasmablastos y/o células plasmáticas inmaduras, transicionales o maduras. Un promotor específico de las células B también puede ser capaz de dirigir la expresión transgénica durante todo el desarrollo de las células B desde células hematopoyéticas en  
30 órganos linfoides primarios y secundarios. Un promotor específico de las células B es preferiblemente capaz de impulsar la expresión transgénica sin afectar el desarrollo de las células B.

35 [0074] Como se usa en el presente documento, el promotor específico de células B puede ser la secuencia promotora/potenciadora de cualquier gen específico de células B, y/o variantes o partes modificadas genéticamente del mismo, que normalmente controla la expresión de genes expresados en una célula B, cuyos ejemplos incluyen promotores/potenciadores de CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD40, CD72, Blimp-1, CD79b (también conocido como B29 o Ig beta), mb-1 (también conocido como Ig alfa), tirosina quinasa blk, VpreB, cadena pesada de inmunoglobulina, cadena ligera κ de inmunoglobulina, cadena ligera λ de inmunoglobulina y cadena J de inmunoglobulina. En una realización particular, el promotor específico de células B es un promotor de cadena ligera  
40 de inmunoglobulina, en particular una cadena ligera κ de inmunoglobulina o una cadena ligera λ de inmunoglobulina, más particularmente una cadena ligera κ de inmunoglobulina; o un promotor CD19.

45 [0075] Otros ejemplos de promotor específico de células B incluyen promotores sintéticos, tales como la quimera del promotor B29 y el potenciador, el promotor MH y el promotor EEK (también llamado FEEK).

[0076] Como es bien conocido por el experto y se describe, por ejemplo, en Sather et al. (2011) Mol. Ther. 19:515-525, la quimera del promotor B29 y el potenciador contiene el promotor de inmunoglobulina β (Igβ) (B29) combinado con el potenciador de inmunoglobulina μ (EμB29).

50 [0077] Como es bien conocido por el experto y se describe, por ejemplo, en la solicitud internacional WO 2010/059876, el promotor MH contiene el promotor de cadena pesada μ humana (VHp) precedido por el potenciador iEμ flanqueado por regiones de asociación a matriz (MAR), y habitualmente es de secuencia 5'-ggattgttta tcttaggagg catgcttact gttaaagac aggatatggt tgaagtggct tctgagaaaa atggtaaga aaattatgac ttaaaaatgt gagagatttt caagtatatt aattttttta actgtccaag tatttgaat tcttatcatt tgattaacac ccatgagtga tatgtgtctg gaattgaggc caaagcaagc tcagctaaga aatactagca  
55 cagtgtctgc ggccccgatg cgggactgcg tttgacat cataaatcaa gttttttt ttaattaatt gagcgaagct ggaagcagat gatgaattag agtcaagatg gctgcatggg ggtctccggc acccacagca ggtggcagga agcaggctcac cgcgagagtc tatttttagga agcaaaaaa cacaattggt aaattatca ctctgggtg tgaagagggt gttttgccca ggcccagatc tgaagtgct ctactgagca aaacaacacc tggacaattt cggtttctaa aataaggcga ggctgaccga aactgaaaag gctttttta actatctgaa tttcatttcc aatcttagct tatcaactgc tagtt tgtgc aaacagcata tcaacttcta aactgcattc atttttaaag taagatggtt aagaaattaa acagtcttag ggagagtta tgactgtatt caaaaagttt tttaaattag ctgttatcc  
60 ctcatgtga taactaatct caaatacttt ttcgatacct cagagcatta tttcataat gactgtgttc acaatcttt tagg ttaact cgttttctct ttgtgattaa ggagaacac ttgatattc tgatagagtg gccttcatt tagtatttt caagaccact ttcaactac tcacttagg ataagttta ggtaaaatgt gcatcattat cctgaattat ttcagttaag catgttagt ggtggcataa gagaaaactc aatcagatag gtaccgagg cccgggatcc gcaggatta gggctgtgc tctcagcatc ccacactgt acagctgatg tggcatctgt gttttcttc tcat ctaga tcaggcttgg agctgtgaaa tacctgcct catgcatatg caaataacct gaggtctct gagataaata tagatatatt ggtgccctga gagcatcaca taacaaccac attctctc tgaagaagcc cctgggagca cagctcatca cc -  
65 3' (SEQ ID NO: 16). Como es bien conocido por el experto y se describe por ejemplo en la solicitud internacional WO 2010/059876, el promotor FEEK contiene el promotor de la cadena ligera κ humana (VKp) precedido por un

potenciador intrónico (iE<sub>κ</sub>), un MAR y un potenciador (3'E<sub>κ</sub>), y habitualmente es de secuencia 5'-taaaccgggtg agtttcatgg ttactgctt gagagatta aaaaaagtaa tgctacctta tgaggagag tcccaggac caagatagca actgcatag caaccgtcac actgcttgg tcaaggagaa gacccttgg ggaactgaaa acagaacctt gagcacatct gttgcttgc ctccatcct cctcaacag ggctgggtgg agcactccac accctt cac cgtctgacg gctcagccag agtaaaaac acaccatga cctggccact gagggttga tcaattcact tgaatttgg cattaataac cattaagga tattaactga tttaaaata agatatattc gtgaccatgt ttttaacttt caaaaatgta gctcccagtg tgtgatttta tttcagttgt acaaaaatc taaacctata gcaatgtgat taataaaaac taaaacatat tttccagtac cttaattctg tgataggaaa attttaatct gagtatttta atttcataat cttaaaaata gttaatgat ttgtcattgt gttgctgctg ttaccaccag ctgat ctcaa aagtgatatt taaggagatt attttggctc gcaacaact gatagggtc agcctctcc acccaacggg tggaatccc cagagggg a ttccaagag gccacctggc agttgctgag ggtcagaagt gaagctagcc acttctct aggcagggtg ccaagattac agttgacctg tacgtgcagc tgtgccagc ctg cccatc cctgctcat ttgcatgtc ccagagcaca acctctgcc ctgaagcctt attaatagc tggtcacact ttgtcgagga gtcagactca gtcaggcac agct-3' (SEQ ID NO: 17). Preferiblemente, dicho promotor específico de células B es el promotor FEEK.

[0078] Más preferiblemente, dicho promotor específico de células B consiste en una secuencia al menos un 90 %, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9 idéntica o 100 % idéntica a la secuencia ID NO: 17, siempre que dicha secuencia conserve las propiedades del promotor FEEK.

**Secuencia A**

[0079] El ácido nucleico multicistrónico de la invención comprende una secuencia (A) que comprende sucesivamente:  
 A1) una secuencia que codifica el dominio variable de la cadena ligera de un anticuerpo de interés, tal como se define anteriormente, fusionada en el marco con  
 A2) una secuencia que codifica la región constante de la cadena ligera de una inmunoglobulina Ig, tal como se define anteriormente.

[0076] Preferiblemente, dicha secuencia A1) incluye la secuencia líder de traducción de la secuencia que codifica dicho dominio variable de cadena ligera.

[0081] Como se usa en el presente documento, la "secuencia líder de traducción" se refiere a una secuencia de ADN ubicada entre la secuencia promotora de un gen y la secuencia codificante. La secuencia líder de la traducción está presente en el ARNm completamente procesado en dirección 5' de la secuencia de inicio de la traducción. La secuencia líder de traducción puede afectar al procesamiento del transcrito primario a ARNm, la estabilidad del ARNm o la eficiencia de la traducción. Los ejemplos de secuencias líderes de traducción son bien conocidos por el experto.

[0082] La secuencia A2) que codifica la región constante de la cadena ligera de una inmunoglobulina Ig puede ser la secuencia que codifica la región constante de la cadena ligera del anticuerpo de interés o la secuencia que codifica la región constante de la cadena ligera de una inmunoglobulina diferente.

[0083] Preferiblemente, dicha región constante de la cadena ligera de una inmunoglobulina Ig es una región constante de cadena ligera κ o una región constante de cadena ligera λ. Más preferiblemente, dicha región constante de la cadena ligera de una inmunoglobulina Ig es una región constante de cadena ligera κ.

[0084] En una realización particular, cuando el dominio de unión a antígeno y la proteína efectora como se definen anteriormente están formados respectivamente por una única subunidad, el ácido nucleico de la invención que codifica una quimera de dominio de unión a antígeno/proteína efectora comprende una secuencia (A) que comprende una secuencia que codifica un dominio de unión a antígeno AbD que interactúa específicamente con un antígeno de interés.

[0085] En otra realización particular, cuando el dominio de unión a antígeno y/o la proteína efectora, tal como se define anteriormente, están formados respectivamente por dos subunidades, el ácido nucleico multicistrónico de la invención que codifica una quimera de dominio de unión a antígeno/proteína efectora comprende una secuencia (A) que comprende sucesivamente:

A1) una secuencia que codifica una primera subunidad AbD1 de un dominio de unión a antígeno AbD, tal como se define anteriormente, fusionada en el marco con

A2) una primera subunidad EfP1 de una proteína efectora EfP, u opcionalmente una secuencia que codifica una proteína efectora EfP, tal como se define anteriormente .

[0086] En esa realización específica, las secuencias A1) y A2) pueden estar unidas además mediante una secuencia que codifica un enlazador proteico que puede ser escindible o no.

[0087] Preferiblemente, la secuencia A de la invención comprende o consiste en al menos 500 nucleótidos, más preferiblemente, al menos 600 nucleótidos, 700, 710 o al menos 720 nucleótidos.

**Secuencia B**

[0088] El ácido nucleico multicistrónico de la invención comprende una secuencia (B) que comprende sucesivamente:  
 B1) una secuencia que codifica el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo de interés, tal como se define

anteriormente, fusionada en el marco con

B2) una secuencia que codifica las regiones constantes de la cadena pesada de una inmunoglobulina Ig' en forma secretora, tal como se define anteriormente;

5 B3) una secuencia intrónica del gen de la cadena pesada de dicha inmunoglobulina Ig', consistiendo dicha secuencia intrónica entre 350 y 450 nucleótidos y comprendiendo un sitio de corte y empalme en 5' interno que permite el corte y empalme de dicha secuencia intrónica B3) y una señal de poli(A) específica secretora (pAS) del exón terminal en 3' de dicho gen;

10 B4) una secuencia, en marco con la secuencia B1), que codifica los dominios transmembrana y citoplasmático M1 y M2 de la inmunoglobulina Ig' BCR, tal como se define anteriormente, en la que dicha secuencia B4) comprende, entre las secuencias codificantes de los dominios M1 y M2, una secuencia intrónica que contiene un sitio de corte y empalme que permite el corte y empalme de dicha secuencia intrónica entre las secuencias codificantes de los dominios M1 y M2; y

B5) una señal de poli(A) específica anclada a membrana (pAM), después del codón de parada del dominio M2.

15 [0089] Preferiblemente, la secuencia B de la invención comprende o consiste en al menos 1800 nucleótidos, más preferiblemente, al menos 1900 nucleótidos, 2000, 2100, 2200, 2300, 2350, 2370, 2380, 2390, 2400, 2410 o al menos 2420 nucleótidos.

20 [0090] Preferiblemente, dicha secuencia B1) incluye la secuencia líder de traducción de la secuencia que codifica dicho dominio variable de cadena pesada.

25 [0091] La secuencia B2) que codifica las regiones constantes de la cadena pesada de una inmunoglobulina Ig' en forma secretora puede ser la secuencia que codifica las regiones constantes de la cadena pesada de dicho anticuerpo de interés o la secuencia que codifica las regiones constantes de la cadena pesada de una inmunoglobulina diferente, por ejemplo de la inmunoglobulina Ig. En particular, la cadena pesada de la inmunoglobulina Ig' puede ser de cualquier isotipo. Preferiblemente, la cadena pesada de la inmunoglobulina Ig' es de un isotipo de IgG.

30 [0092] En una realización preferida, las regiones constantes de la cadena pesada de una inmunoglobulina Ig' en forma secretora son las regiones constantes de una cadena pesada de IgG secretora, en particular de una cadena pesada de IgG<sub>1</sub> o IgG<sub>2</sub> secretoras. El uso de las regiones constantes de una cadena pesada de IgG<sub>1</sub> secretora es particularmente ventajoso porque dicha IgG<sub>1</sub> tiene una semividua más larga y puede inducir reacciones inmunes de tipo opsonización o de activación del complemento.

35 [0093] Por consiguiente, en una realización preferida, las regiones constantes de una cadena pesada de inmunoglobulina Ig' secretora son las regiones constantes de una cadena pesada de IgG<sub>1</sub> secretora.

[0094] En una realización particular, la secuencia B2) codifica las tres regiones constantes de una cadena pesada de inmunoglobulina Ig' secretora, tal como se define anteriormente.

40 [0095] Más preferiblemente, la secuencia B2) codifica sucesivamente la bisagra C, H, las regiones C<sub>2</sub>H y C<sub>3</sub>H de una cadena pesada de inmunoglobulina Ig' secretora. Aún preferiblemente, en la secuencia que codifica las regiones C<sub>3</sub>H en la secuencia B2), se elimina el codón de parada de esta región C<sub>3</sub>H.

45 [0096] En una realización particular, cuando el dominio de unión a antígeno y la proteína efectora, tal como se definen anteriormente, están formados respectivamente por una única subunidad, el ácido nucleico de la invención que codifica una quimera de dominio de unión a antígeno/proteína efectora comprende una secuencia (B) que comprende sucesivamente:

B2) una secuencia que codifica una proteína efectora EfP;

50 B3) una secuencia intrónica del gen de la cadena pesada de una inmunoglobulina Ig', consistiendo dicha secuencia intrónica entre 350 y 450 nucleótidos y comprendiendo un sitio de corte y empalme en 5' interno que permite el corte y empalme de dicha secuencia intrónica B3) y una señal de poli(A) específica secretora (pAS) del exón terminal en 3' de dicho gen;

55 B4) una secuencia, en marco con la secuencia B2), que codifica los dominios transmembrana y citoplasmático M1 y M2 de la inmunoglobulina Ig' BCR, en la que dicha secuencia B4) comprende, entre las secuencias codificantes de los dominios M1 y M2, una secuencia intrónica que contiene un sitio de corte y empalme que permite el corte y empalme de dicha secuencia intrónica entre las secuencias codificantes M1 y M2; y

B5) una señal de poli(A) específica anclada a membrana (pAM), después del codón de parada del dominio M2.

60 [0097] En otra realización particular, cuando el dominio de unión a antígeno y/o la proteína efectora, tal como se definen anteriormente, están formados respectivamente por dos subunidades, el ácido nucleico multicistrónico de la invención que codifica una quimera de dominio de unión a antígeno/proteína efectora comprende una secuencia (B) que comprende sucesivamente:

65 B1) una secuencia que codifica una segunda subunidad AbD2 del dominio de unión a antígeno AbD, formando AbD2 en combinación con AbD1 un dominio de unión a antígeno que interactúa específicamente con un antígeno de interés, estando dicha secuencia B1 fusionada en el marco con

B2) una secuencia que codifica una segunda subunidad EfP2 de la proteína efectora EfP o una secuencia que codifica

la proteína efectora EfP;

B3) una secuencia intrónica del gen de la cadena pesada de una inmunoglobulina Ig', consistiendo dicha secuencia intrónica entre 350 y 450 nucleótidos y comprendiendo un sitio de corte y empalme en 5' interno que permite el corte y empalme de dicha secuencia intrónica B3) y una señal de poli(A) específica secretora (pAS) del exón terminal en 3' de dicho gen;

B4) una secuencia, en marco con la secuencia B1), que codifica los dominios transmembrana y citoplasmático M1 y M2 de la inmunoglobulina Ig' BCR, en la que dicha secuencia B4) comprende, entre las secuencias codificantes de los dominios M1 y M2, una secuencia intrónica que contiene un sitio de corte y empalme que permite el corte y empalme de dicha secuencia intrónica entre las secuencias codificantes M1 y M2; y

B5) una señal de poli(A) específica anclada a membrana (pAM), después del codón de parada del dominio M2.

[0098] En esa realización particular, las secuencias B1) y B2) pueden estar unidas además mediante una secuencia que codifica un enlazador proteico que puede ser escindible o no.

[0099] Los inventores demostraron que el tamaño de la secuencia intrónica B3) tenía un impacto en la eficacia del corte y empalme del ARNm en una forma anclada a la membrana y/o secretora. En particular, demostraron que se podía obtener un corte y empalme óptimo cuando la secuencia intrónica B3) se acortaba de 400 a 350 nucleótidos en comparación con la secuencia intrónica de tipo salvaje del gen de dicha cadena pesada de inmunoglobulina Ig'.

[0100] Por consiguiente, en una realización divulgada, la secuencia intrónica B3) comprende o consiste preferiblemente entre 200 y 1500 nucleótidos, aún preferiblemente entre 250 y 1500 nucleótidos, aún preferiblemente entre 300 y 1500 nucleótidos, aún preferiblemente entre 350 y 1500 nucleótidos, todavía preferiblemente entre 360 y 1400 nucleótidos, entre 365 y 1300 nucleótidos, entre 366 y 1200 nucleótidos, entre 367 y 1100 nucleótidos, entre 368 y 1000 nucleótidos, entre 369 y 900 nucleótidos, entre 370 y 800 nucleótidos, entre 371 y 700 nucleótidos, entre 372 y 600 nucleótidos, entre 373 y 550 nucleótidos, entre 374 y 500 nucleótidos, entre 375 y 450 nucleótidos, entre 375 y 400 nucleótidos, entre 375 y 395 nucleótidos, entre 375 y 390 nucleótidos, 389, 388, 387, 386, 385, 384, 383, 382, 381, 380, 379, 378, 377, 376 o 375 nucleótidos.

[0101] El sitio de empalme 5' interno incluido en la secuencia B3) permite el empalme de dicha secuencia intrónica B3) entre la última región constante y el exón M1 en dirección 3' para producir un ARNm específico anclado a la membrana.

[0102] Preferiblemente, el sitio de empalme 5' interno incluido en la secuencia B3) comprende un sitio donante y un sitio aceptor. En realizaciones particulares, el sitio de empalme 5' interno incluido en la secuencia B3) comprende un -sitio donante ubicado en dirección 5' de la secuencia B3), habitualmente al final de la secuencia B2), y un sitio aceptor ubicado preferiblemente al final de dicha secuencia B3).

[0103] Preferiblemente, dicho sitio donante comprende una secuencia GU. Más preferiblemente, dicho sitio donante consiste en la secuencia GU. Preferiblemente, dicho sitio donante está ubicado entre 10 y 6 nucleótidos antes del final de la secuencia B2), más preferiblemente 8 nucleótidos antes del final de la secuencia B2).

[0104] Preferiblemente, dicho sitio aceptor comprende una secuencia AG. Preferiblemente, el sitio aceptor comprende además un tracto de polipirimidina en dirección 5' desde la secuencia AG. Más preferiblemente, dicho sitio aceptor consiste en la secuencia AG. Preferiblemente, dicho sitio aceptor está ubicado de 3 a 1 nucleótidos antes del comienzo de la secuencia B4), más preferiblemente 2 nucleótidos antes del comienzo de la secuencia B4).

[0105] Preferiblemente, la señal de pAS incluida en la secuencia B3) comprende la secuencia consenso aataaa. Aún preferiblemente, la señal de pAS comprende una región rica en AU, preferiblemente que comprende o consiste en de 5 a 20 nucleótidos, y/o una región rica en GU, preferiblemente que comprende o consiste en 5 a 20 nucleótidos.

[0106] Lo más preferiblemente, la señal de pAS comprende o consiste en la secuencia aataaa o una secuencia al menos 80 % idéntica, más preferiblemente al menos 90 %, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8 o al menos 99,9% idéntica a la secuencia aataaa, siempre que dicha secuencia conserve la propiedad de señal de poliadenilación de pAS.

[0107] Alternativamente, la señal de pAS incluida en la secuencia B3) es la señal de pAS natural de otra secuencia génica.

[0108] Alternativamente, la señal de pAS incluida en la secuencia B3) es una señal de pAS sintética. Puede comprender además una secuencia bloqueadora de la transcripción, tal como se define a continuación.

[0109] Aún preferiblemente, la secuencia B3) comprende además secuencias potenciadoras de corte y empalme y/o silenciadoras.

[0110] Los inventores demostraron que la secuencia intrónica incluida en la secuencia B4) entre las secuencias que codifican los dominios M1 y M2 era sorprendentemente necesaria para obtener una regulación adecuada de la

expresión de una forma anclada a la membrana y/o una forma secretada del anticuerpo de interés según la etapa de maduración de la célula B a la que se incorpora.

5 [0111] Demostraron además que el tamaño de dicha secuencia intrónica tenía un impacto en la eficiencia del corte y empalme del ARNm en una forma anclada a la membrana. En particular, demostraron que se podía obtener un corte y empalme óptimo cuando dicha secuencia intrónica se acortaba a de 200 a 250 nucleótidos en comparación con la secuencia intrónica de tipo salvaje.

10 [0112] Por consiguiente, la secuencia intrónica incluida en la secuencia B4) comprende o consiste preferiblemente en entre 200 y 1500 nucleótidos, aún preferiblemente entre 205 y 1400 nucleótidos, entre 206 y 1300 nucleótidos, entre 207 y 1200 nucleótidos, entre 208 y 1100 nucleótidos, entre 209 y 1000 nucleótidos, entre 210 y 900 nucleótidos, entre 211 y 800 nucleótidos, entre 212 y 700 nucleótidos, entre 213 y 600 nucleótidos, entre 214 y 500 nucleótidos, entre 215 y 400 nucleótidos, entre 216 y 350 nucleótidos, entre 217 y 300 nucleótidos, entre 217 y 250 nucleótidos, 249, 248, 2487, 246, 245, 244, 243, 242, 241, 240, 239, 238, 237, 236, 235, 234, 233, 232, 231, 230, 229, 228, 227, 225, 15 224, 223, 221, 220, 219, 218 o 217 nucleótidos. Alternativamente, la secuencia intrónica incluida en la secuencia B4) comprende o consiste en la secuencia intrónica de tipo salvaje correspondiente de longitud completa.

20 [0113] El sitio de corte y empalme incluido en la secuencia intrónica de dicha secuencia B4) permite el corte y empalme de dicha secuencia intrónica entre los exones M1 y M2 para producir un ARNm específico anclado a la membrana.

[0114] Preferiblemente, el sitio de corte y empalme incluido en la secuencia B4) comprende un sitio donante y un sitio aceptor.

25 [0115] Preferiblemente, dicho sitio donante en B4) comprende una secuencia de GU. Más preferiblemente, dicho sitio donante en B4) consiste en la secuencia de GU. Preferiblemente, dicho sitio donante en B4) está ubicado de 3 a 1 nucleótidos después del final de la secuencia codificante de M1, más preferiblemente 2 nucleótidos después del final de la secuencia codificante de M1.

30 [0116] Preferiblemente, dicho sitio aceptor en B4) comprende una secuencia de AG. Preferiblemente, el sitio aceptor en B4) comprende además un tracto de polipirimidina en dirección 5' de la secuencia de AG. Más preferiblemente, dicho sitio aceptor en B4) consiste en la secuencia de AG. Preferiblemente, dicho sitio aceptor en B4) está ubicado de 3 a 1 nucleótidos antes del comienzo de la secuencia codificante de M2, más preferiblemente 2 nucleótidos antes del comienzo de la secuencia codificante de M2.

35 [0117] Aún preferiblemente, el sitio de corte y empalme incluido en la secuencia B4) comprende un sitio AATAAA y/o un punto de ramificación, tal como se define anteriormente.

[0118] Aún preferiblemente, la secuencia B4) comprende además secuencias potenciadoras de corte y empalme y/o silenciadoras.

40 [0119] Preferiblemente, la señal de pAM incluida en la secuencia B5) comprende la secuencia consenso aataaa. Aún preferiblemente, la señal de pAM comprende además una región rica en AT, preferiblemente que comprende o consiste en de 5 a 20 nucleótidos, y/o una región rica en GT, preferiblemente que comprende o consiste en 5 a 20 nucleótidos.

45 [0120] Los inventores demostraron sorprendentemente que la producción de ARNm específico anclado a la membrana se optimizaba aún más cuando la señal de pAM natural se reemplazaba por una señal de pAM sintética.

50 [0121] Preferiblemente, la señal de pAM es una señal de pAM sintética. Aún preferiblemente, dicha señal de pAM comprende además una secuencia bloqueadora de la transcripción. La presencia de la secuencia bloqueadora de la transcripción permite minimizar los riesgos de mutagénesis asociados con la lectura de la polimerasa.

55 [0122] Las secuencias bloqueadoras de la transcripción son bien conocidas por el experto y se describen, por ejemplo, en Enriquez-Harris et al. (1991) EMBO J. 10:1833-184 y Levitt et al. (1989) Genes Dev. 3:1019-1025.

[0123] Lo más preferiblemente, la señal de pAM comprende o consiste en la secuencia 5'-aataaatatctttatttcattacatctgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgtgaatcgatagtagtactaacaatacgctctccatcaaaacaaaacga aacaaaacaaactagcaaaataggctgtcccagtgcaagtgccaggtgccagaaacatttctct-3' (SEQ ID NO: 18) o una secuencia al menos 80% idéntica, más preferiblemente al menos 90%, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8 o al menos 99,9% idéntica a la secuencia SEQ ID NO: 18, siempre que dicha secuencia conserve la propiedad de señal de poliadenilación de pAM.

60 [0124] Alternativamente, la señal de pAM es la señal de pAM de tipo salvaje del gen de dicha cadena pesada de inmunoglobulina Ig' o la señal de pAS natural de otra secuencia génica.

65 [0125] Preferiblemente, las secuencias B3), B4) y/o B5) están optimizadas en codones para limitar el corte y empalme

inadecuado debido a la posible presencia de sitios donante y aceptores de corte y empalme crípticos. Las técnicas para identificar sitios donantes y aceptores de corte y empalme crípticos son bien conocidas por los expertos e incluyen, por ejemplo, el uso de algoritmos de predicción de corte y empalme in silico, tales como el algoritmo descrito en Reese et al. (1997) J. Comput. Biol. 4:311-323. Una vez que se identifican dichos sitios donantes y aceptores de corte y empalme crípticos, por ejemplo, normalmente se pueden mutar de uno a cinco nucleótidos de estos sitios, por ejemplo, mediante sustitución para suprimirlos.

[0126] Preferiblemente, la secuencia B3) comprende o consiste en la secuencia  
 5'-tgagtgccacggccggcaagccccgctcccaggctctcgggctcgcgaggatgcttgccacgtaccccgtgtacatactcccag  
 gcaaccagcatggaataaagcaccagcgtccctggcccctgcgagactgtgatgggtcttccacgggtcaggccgagtctgagg  
 cctgagtggcatgagggaggcagagtgggtcccactgtcccacactggcccaggctgtggtggggagctgacctcaggacattgtgg  
 cccatcccggccggccctacatcctgggtcctgccacagaggaatcacccccagaggcccaagcccagggggacacagcactga  
 ccacccctctctgtccagag-3' (SEQ ID NO: 31).

[0127] Preferiblemente, la secuencia B4) comprende o consiste en la secuencia  
 5'-gtcggcgcacgtgtccccagctgtcctgacattgtccccatgctgtcacaactgtctgtgacactgtcccacaggtgtccccacctgt  
 ccctgacgtcgcgggtgggtggcctgggggagagaggtggcctcagtgccctgaggggtgggtggggctcgggggagggctgtg  
 gcctcgtcaccctgtgctgtgcctgtcctacag-3' (SEQ ID NO: 32).

[0128] Los inventores demostraron que con las secuencias intrónicas más cortas se evitaba la mejor disminución de los títulos virales. Sin embargo, las secuencias intrónicas deben permanecer lo suficientemente largas como para incluir sitios de corte y empalme y poliadenilación adecuados. Por consiguiente, en realizaciones divulgadas particularmente preferidas, la secuencia intrónica B3) comprende o consiste en menos de 150 nucleótidos y más de 125 nucleótidos y/o la secuencia intrónica incluida en la secuencia B4) comprende o consiste en menos de 250 nucleótidos y más de 210 nucleótidos.

[0129] Lo más preferiblemente, el ácido nucleico multicistrónico descrito en el presente documento comprende sucesivamente:

- el promotor FEEK,
- una secuencia de Kozak
- la secuencia líder de traducción de la secuencia que codifica el dominio variable de cadena ligera del anticuerpo de interés,
- la secuencia que codifica el dominio variable de cadena ligera del anticuerpo de interés,
- la secuencia que codifica el dominio constante de una cadena ligera  $\kappa$ ,
- la secuencia que codifica un sitio de escisión por furina,
- una secuencia optimizada que codifica el péptido F2A,
- la secuencia líder de traducción de la secuencia que codifica el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo de interés,
- la secuencia que codifica el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo de interés,
- la secuencia que codifica la región C<sub>1</sub>H de una inmunoglobulina Ig', preferiblemente del anticuerpo de interés, opcionalmente optimizada para suprimir sitios de corte y empalme crípticos,
- la secuencia que codifica la región bisagra de Ig', preferiblemente del anticuerpo de interés,
- la secuencia que codifica la región C<sub>2</sub>H de Ig', preferiblemente del anticuerpo de interés, opcionalmente optimizada para suprimir sitios de corte y empalme crípticos,
- la secuencia que codifica la región C<sub>3</sub>H de la forma secretora de Ig', preferiblemente del anticuerpo de interés, opcionalmente optimizada para suprimir los sitios de corte y empalme crípticos, y en la que se ha eliminado el codón de parada,
- una secuencia intrónica optimizada del gen de la cadena pesada de Ig', preferiblemente del anticuerpo de interés, comprendiendo dicha secuencia intrónica el sitio de corte y empalme 5' interno y la señal de poli(A) (pAS) específica secretora del exón terminal 3' de dicho gen,
- la secuencia que codifica el dominio M1 de la versión anclada a la membrana de Ig', preferiblemente del anticuerpo de interés, opcionalmente optimizada para suprimir sitios de corte y empalme crípticos,
- una secuencia intrónica optimizada del gen que codifica los dominios M1 y M2 de la forma anclada a la membrana de Ig', preferiblemente del anticuerpo de interés, que contiene sitios de corte y empalme aceptor y donante,
- la secuencia que codifica el dominio M2 de la forma anclada a la membrana de Ig', preferiblemente del anticuerpo de interés, opcionalmente optimizada para suprimir sitios de corte y empalme crípticos, e incluye el codón de parada, y
- una señal sintética de poli(A) (pAM) específica anclada a membrana y un bloqueador de la transcripción.

[0130] El ácido nucleico multicistrónico de la invención se puede transferir a una célula diana, en particular a células madre hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> o células B, mediante cualquier procedimiento de transfección bien conocido por el experto, tal como mediante electroporación, microporación o técnicas químicas de transfección.

[0131] Alternativamente, el ácido nucleico multicistrónico de la invención se puede transferir a una célula diana usando vectores virales, tales como vectores de adenovirus, vectores de virus adenoasociados (AAV) o vectores de retrovirus.

*Vector retroviral de transferencia*

[0132] Los inventores diseñaron específicamente un vector retroviral de transferencia, que puede ser parte de un sistema de empaquetamiento retroviral, que permite la transferencia, a través de partículas de vector retroviral, del ácido nucleico multicistrónico de la invención a células diana, a saber, células madre hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> o células B.

[0133] Por lo tanto, la presente invención también se refiere a un vector retroviral de transferencia que comprende:

(i) un esqueleto retroviral de transferencia, y

(ii) el ácido nucleico multicistrónico según la invención o el ácido nucleico de la invención en orientación inversa.

[0134] El vector retroviral de transferencia según la invención es un plásmido de vector de transferencia que incluye el transgén que se va a transferir a la célula diana. Por lo tanto, el vector retroviral según la invención incluye habitualmente un esqueleto retroviral de transferencia, que contiene secuencias genéticas que actúan en cis de un retrovirus necesarias para que el vector infecte la célula diana, y el ácido nucleico multicistrónico según la invención o el ácido nucleico según la invención, que contiene la secuencia de interés a transferir, a saber la secuencia que codifica el anticuerpo de interés. Por lo tanto, el esqueleto retroviral de transferencia incluye habitualmente las repeticiones terminales largas (LTR) para el control de la transcripción y la integración, la secuencia psi necesaria para la encapsidación y las secuencias del sitio de unión del cebador (PBS) y del tracto de polipurina (PPT) necesarias para la transcripción inversa del genoma retroviral.

[0135] 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 *Retroviridae*. Los retrovirus se dividen en Oncovirus, Lentivirus y Espumavirus. Preferiblemente, dicho retrovirus es un oncovirus, por ejemplo MLV, ALS, RSV o MPMV, un lentivirus, por ejemplo VIH-1, VIH-2, VIS, EIAV o CAEV, o un espumavirus, 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 VIS.

[0136] Como es conocido por el experto, se pueden usar diferentes tipos de esqueletos retrovirales de transferencia dependiendo del tipo de sistema de empaquetamiento retroviral al que está destinado, a saber la 1<sup>a</sup> generación, la 2<sup>a</sup> generación, la 3<sup>a</sup> generación o la 4<sup>a</sup> generación del sistema de empaquetamiento retroviral.

[0137] Como es conocido por el experto, en la 1<sup>a</sup> generación del sistema de empaquetamiento retroviral, se producen partículas virales vivas a partir de un vector retroviral de transferencia que porta todos los genes del retrovirus, a saber los genes que codifican proteínas centrales retrovirales, enzimas y factores accesorios junto con el transgén, y de un plásmido separado que lleva un gen de envoltura. El transgén normalmente está bajo el control de una 5'-LTR de tipo salvaje.

[0138] Por el contrario, como es conocido por el experto, en la segunda generación del sistema de empaquetamiento retroviral, se eliminan 5 de los 9 genes del retrovirus, dejando sólo las regiones gag/pol y tat/rev. El transgén normalmente está bajo el control de una 5'-LTR de tipo salvaje. Las regiones gag/pol/tat/rev normalmente están presentes en un plásmido separado.

[0139] Como es conocido por el experto, la tercera generación del sistema de empaquetamiento retroviral contiene sólo genes gag, pol y rev. Los genes gag/pol y rev suelen estar presentes en dos plásmidos separados. El transgén normalmente está bajo el control de una 5'-LTR quimérica para garantizar la transcripción en ausencia de tat. En esta 5'-LTR quimérica, la región U3 normalmente se reemplaza por un promotor/potenciador constitutivamente activo, tal como RSV o CMV.

[0140] Finalmente, como es conocido por el experto, en la cuarta generación del sistema de empaquetamiento retroviral, los genes gag y pol están optimizados adicionalmente en codones y están presentes en dos plásmidos separados.

[0141] Preferiblemente, el esqueleto retroviral de transferencia contenido en el vector retroviral de transferencia según la invención es un esqueleto retroviral de tercera o cuarta generación.

[0142] En una realización particularmente preferida, el esqueleto retroviral de transferencia contenido en el vector retroviral de transferencia según la invención es un esqueleto retroviral autoinactivante.

[0143] Por "esqueleto retroviral autoinactivante" se entiende en el presente documento una construcción retroviral que tiene una delección en el elemento U3 de la LTR 3' de la construcción, y que da como resultado, después de la replicación, una delección también en el promotor y potenciador de LTR 5' y evita la transcripción del promotor interno específico de la célula, que de otro modo podría activar oncogenes celulares silenciosos.

[0144] En una realización particularmente preferida, el esqueleto retroviral de transferencia contenido en el vector retroviral de transferencia según la invención es un esqueleto retroviral autoinactivante de 3<sup>a</sup> o 4<sup>a</sup> generación, más particularmente, un esqueleto lentiviral autoinactivante de 3<sup>a</sup> o 4<sup>a</sup> generación.

[0145] De este modo, en una realización particular, el esqueleto retroviral de transferencia contenido en el vector retroviral de transferencia según la invención comprende sucesivamente:

- (i1) una LTR 5' modificada que comprende un potenciador de CMV sustituido por la región U3,
- (i2) una secuencia psi y gag,
- (i3) una secuencia tracto central de polipurina (cPPT)/flap de ADN,
- (i4) una secuencia de elemento sensible a Rev (RRE),
- (i5) una secuencia del elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE), y
- (i6) una LTR 3' autoinactivante que comprende una delección en la región U3 que hace que la LTR 5' del provirus integrado sea transcripcionalmente inactiva,

[0146] Por "secuencia de elementos sensibles a Rev" o "RRE" se entiende en el presente documento un segmento de ARN altamente estructurado presente en la región codificante de *env* de ARNm virales no empalmados y parcialmente empalmados. En presencia de Rev, los ARNm de retrovirus que contienen RRE se pueden exportar desde el núcleo al citoplasma para traducirlos y posteriormente empaquetarlos. La secuencia de ácido nucleico de RRE es habitualmente  
 5'-tcctgggttcttgggagcagcaggaagcactatgggagcagcgtaatgacgctgacggtacaggccagacaattattgtctggtatagtcgagcagcagaacaatttgetgaggetattgaggegaacagcatctgttgcaactcacagtetggggcatcagcagctccaggcaagaatctggctgt gaaagataacct-3' (SEQ ID NO: 19).

[0147] Por "secuencia de tracto central de polipurina (cPPT)/flap de ADN" se entiende en el presente documento un sitio de iniciación, desde el cual, durante la retrotranscripción lentiviral, la síntesis de ADN normalmente comienza junto con el tracto de polipurina (PPT). El solapamiento de la cadena positiva obtenida se denomina flap central de ADN (99 nucleótidos), que se sabe que desempeña un papel en la mejora de la importación nuclear de provirus lentivirales. En el campo de la tecnología de lentivectores, es de conocimiento general que la introducción de este elemento cPPT que actúa en cis en el plásmido del vector de transferencia aumenta en gran medida la eficiencia de transducción del vector en ciertos tipos de células, particularmente en células madre hematopoyéticas, tal como se describe, por ejemplo, en Van Maele et al. (2003) J. Virol. 77:4685-4694. La secuencia de ácido nucleico de cPPT es habitualmente  
 5'-tccacaattttaaagaaaaggggggattgggggtacagtcaggggaaagaatagtagacataatagcaacagacacaaactaaagaattacaaaacaattacaaaattcaaaattt-3' (SEQ ID NO: 20).

[0148] Por "elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota ("Woodchuck")" o "WPRE" se entiende en el presente documento una secuencia de ADN que, cuando se transcribe, crea una estructura terciaria que mejora la expresión. La presencia de WPRE, en particular en combinación con cPPT, permite de este modo aumentar la eficiencia de la transducción y la expresión transgénica. La secuencia de ácido nucleico de WPRE es habitualmente  
 5'-aatcaacctctggattacaaaattgtgaaagattgactgattctt aactatgttctcctttacgctatgtggatcagctgtcttaatgcctttgtatcatgctattgtctcccgatggctttcctctctgtataaaatcctgggtgctctctttatgaggagttggtggcaggaacgctggcgtgggtgctgctgacgcaacccccactggtggggcattggccaccctgctccttccgggaetttegtttccccctccctattgccacggcggaact catcgccgctgctgcccgtgctggacaggggctcggtgtggg cactgacaattccgtggtgtgtggtgggaagctgaegtcttccatggctgctgocctgtgttggccactggattetgeggggac gteettgctactgctcctcggcctcaatccag eggacctcctcccgaggcctgctgcccgtctgcccctctccgcttetggcc ttcgacctcagacgagteggatctcccttt gggccgctcccccgc-3' (SEQ ID No: 21). Por WPRE también se entiende en el presente documento un WPRE mejorado, tal como el WPRE mejorado descrito en Zanta-Boussif et al. (2009) Gene Therapy 16:605-619, por ejemplo un WPRE mejorado de secuencia  
 5'-aatcaacctctggattacaaaattgtgaaagattgactgattcttaactatgttgcctttacgctatgtggatcagctgtctta atg cctttgtatcatg ctattg ctcccg tatg gctttcattttctcctcctgt tataaatcc tg g ttg ctg tctctttatg ag g ag ttg tg gc cgg ttg tcag g caacg tggcgtggtgtg cactg tg tttg ctg acg caacccccactg g ttg ggg cattg ccaccacctgtcag c tctttccgggactttcgtcttccccctcctattgccacggcggaactcatcgccgctgctgcccgtgctggacaggggctcggctgtgggactgacaattccgtggtgtgtcgggaaatcatcgctccttccgtgctgocctg tgttggccactgcattc tgcgcccggcagctccttctgctacgctccctcggccctcaatccagcggaccttccctccggcggcctgctgcccgtctgcccggcc tcttccgctcttgccttgcctcagacgagtcggatctcccttgggcccctcccgcacatcga-3' (SEQ ID NO: 22).

[0149] En esta realización particular, el ácido nucleico multicistrónico según la invención está situado preferiblemente en orientación inversa entre las secuencias (i4) y (i5). Por consiguiente, en una realización particular, el vector retroviral de transferencia de la invención comprende sucesivamente:

- (i1) una LTR 5' modificada que comprende un potenciador de CMV sustituido por la región U3,
  - (i2) una secuencia psi y gag,
  - (i3) una secuencia flap de ADN/tracto central de polipurina (cPPT),
  - (i4) una secuencia de elemento sensible a Rev (RRE),
  - (i5) una secuencia del elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE), y
  - (i6) una LTR 3' autoinactivante que comprende una delección en la región U3 que hace que la LTR 5' del provirus integrado sea transcripcionalmente inactiva,
- en el que el ácido nucleico multicistrónico o ácido nucleico (ii) está ubicado en orientación inversa entre las secuencias (i4) y (i5).

[0150] El hecho de que el ácido nucleico multicistrónico o el ácido nucleico esté ubicado en orientación inversa en el vector retroviral de transferencia ayuda a conservar los sitios de empalme durante la producción de partículas del vector.

*Partícula de vector viral pseudotipada condicional*

5 [0151] El vector retroviral de transferencia definido en la sección "*Vector retroviral de transferencia*" anterior es particularmente útil para la producción de una partícula de vector viral pseudotipada condicional que permite la expresión fisiológicamente regulada de anticuerpo anclado a membrana y/o secretado por células B.

10 [0152] Por lo tanto, la presente invención también se refiere a una partícula de vector viral pseudotipada condicional que permite la expresión fisiológicamente regulada de anticuerpo anclado a la membrana y/o secretado por células B, en donde dicha partícula de vector viral pseudotipada condicional comprende el ácido nucleico multicistrónico según la invención y está preferiblemente pseudotipada con una glicoproteína de la envoltura viral que reconoce células B o células madre hematopoyéticas CD34<sup>+</sup>, tal como se define a continuación.

15 [0153] La presente invención también se refiere a una partícula de vector viral pseudotipada condicional que permite la expresión fisiológicamente regulada de quimera de proteína efectora/dominio de unión a antígeno anclada a la membrana y/o secretada por células B, en la que dicha partícula de vector viral pseudotipada condicional comprende el ácido nucleico multicistrónico o ácido nucleico que codifica la quimera de dominio de unión a antígeno/proteína efectora según la invención y está preferiblemente pseudotipada con una glicoproteína de la envoltura viral que reconoce células B o células madre hematopoyéticas CD34<sup>+</sup>, tal como se define a continuación.

20 [0154] Por "partícula de vector viral pseudotipada condicional que permite la expresión fisiológicamente regulada de anticuerpo anclado a membrana y/o secretado por células B" se entiende en el presente documento una partícula de vector viral pseudotipada capaz de transferirse específicamente a células madre hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> o células B, un ácido nucleico que codifica un anticuerpo, siendo expresado dicho anticuerpo por dichas células en forma anclada a la membrana y/o en forma secretada, dependiendo del estado de maduración de dicha célula.

25 [0155] El término "condicional" en el presente documento se refiere al hecho de que el anticuerpo se expresa condicionalmente en forma anclada a la membrana y/o en forma secretada, siendo la condición el estado de maduración de la célula madre hematopoyética CD34<sup>+</sup> o célula B por la cual es expresado.

30 [0156] Normalmente, las partículas de vector viral pseudotipadas condicionales de la invención permiten la expresión principal de un anticuerpo de interés en forma anclada a la membrana por células B maduras y la expresión principal de ese anticuerpo de interés en forma secretada por células plasmáticas.

35 [0157] Para reconocer específicamente células madre hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> y células B, es particularmente ventajoso utilizar una partícula de vector viral condicional pseudotipada con una proteína de envoltura que permite la transducción específica de estas células.

40 [0158] Por consiguiente, en una realización particular, la partícula de vector viral pseudotipada condicional de la invención comprende además:  
 - glicoproteínas de hemaglutinina (H) y de fusión (F) del virus del sarampión (MV) modificado, en particular virus del sarampión de Edmonston, en las que los dominios de la cola citoplasmática están truncados,  
 - una glicoproteína de envoltura quimérica que comprende o consiste en una fusión del dominio transmembrana y extracelular de una glicoproteína de la envoltura del retrovirus endógeno de babuino (BaEV) y el dominio de la cola citoplasmática de una glicoproteína de la envoltura del virus de la leucemia murina (MLV), o  
 45 - una glicoproteína de la envoltura del BaEV modificada en la que el dominio de la cola citoplasmática está desprovisto del péptido R inhibidor de la fusión.

50 [0159] Dichas glicoproteínas H y F de MV modificadas se describen, por ejemplo, en Frecha et al. (2008) Blood 112:4843-4852 e incluyen glicoproteínas H en las que el dominio de la cola citoplasmática está truncado de sus primeros 15 (HΔ15), 20 (HΔ20) o 24 (HΔ24) aminoácidos, y glicoproteínas F en las que el dominio de la cola citoplasmática está truncado de sus últimos 30 (FΔ30) aminoácidos. En una realización particularmente preferida, la partícula de vector viral pseudotipada condicional de la invención comprende además glicoproteínas HΔ24 y FΔ30 de MV modificadas.

55 [0160] Dicha glicoproteína de envoltura quimérica y glicoproteína de envoltura de BaEV modificada se describen, por ejemplo, en la solicitud internacional WO 2013/045639.

60 [0161] En una realización particularmente preferida, la partícula de vector viral pseudotipada condicional de la invención comprende además una glicoproteína de la envoltura del BaEV modificada en la que el dominio de la cola citoplasmática está desprovisto del péptido R inhibidor de la fusión, más particularmente una glicoproteína de la envoltura del BaEV modificada que comprende o consiste en la secuencia SEQ ID NO: 23.

65 [0162] El experto puede preparar fácilmente partículas de vectores virales, por ejemplo, siguiendo la guía general proporcionada por Sandrin al. (2002) Blood 100:823-832. Brevemente, las partículas de vector viral pueden generarse coexpresando los elementos de empaquetamiento (es decir, los componentes central y enzimático), el componente

del genoma y el componente de la envoltura en una denominada célula productora, por ejemplo, células de riñón embrionario humano 293 T. Normalmente, se pueden emplear de tres a cuatro plásmidos, pero el número puede ser mayor dependiendo del grado en que los componentes lentivirales se descomponen en unidades separadas.

5 [0163] En una realización particularmente preferida, la partícula de vector viral pseudotipada condicional de la invención se puede obtener o se obtiene mediante el procedimiento de producción descrito en la sección "*Procedimiento de producción de partículas de vector viral*" a continuación.

*Procedimiento de producción de partículas de vector viral*

10 [0164] La presente solicitud describe un procedimiento para producir una partícula de vector viral pseudotipada condicional que permite la expresión fisiológicamente regulada de un anticuerpo anclado a la membrana y/o secretado o quimera por células B, que comprende:

a) transfectar una célula con

15 (i) el vector retroviral de transferencia de la invención definido en la sección "*Vector retroviral de transferencia*" anterior,

(ii) un segundo ácido nucleico que comprende un ADNc que codifica proteínas centrales del mismo retrovirus que el vector retroviral de transferencia (i), y

20 (iii) un tercer ácido nucleico que comprende un ADNc que codifica una glicoproteína de la envoltura viral que reconoce células B o células madre hematopoyéticas CD34<sup>+</sup>,

para producir una célula productora;

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

c) permitir que las proteínas virales codificadas formen partículas de vector viral pseudotipadas condicionales.

25 [0165] La "proteína central de un retrovirus" se refiere a proteínas codificadas por los genes gag y pol. El gen gag codifica una poliproteína que se procesa posteriormente por la proteasa retroviral en proteínas estructurales que componen el centro. El gen pol codifica la proteasa retroviral, la transcriptasa inversa y la integrasa.

30 [0166] Por "glicoproteína de la envoltura viral que reconoce células B o células madre hematopoyéticas CD34<sup>+</sup>" se entiende en el presente documento una glicoproteína de la envoltura viral que media la transducción de células B o células madre hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> por el virión o la partícula de vector viral pseudotipada que lo porta.

[0167] Preferiblemente, la glicoproteína de la envoltura viral que reconoce células B o células madre hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> es una hemaglutinina (H) modificada del virus del sarampión (MV), en particular el virus del sarampión de Edmonston, y glicoproteínas de fusión (F), en donde los dominios de cola citoplasmática están truncados, una glicoproteína de la envoltura del BaEV, una glicoproteína de la envoltura quimérica que comprende o consiste en una fusión del dominio transmembrana y extracelular de una glicoproteína de la envoltura del BaEV y el dominio de la cola citoplasmática de una glicoproteína de la envoltura del MLV, o una glicoproteína de la envoltura del BaEV modificada, en la que el dominio de la cola citoplasmática está desprovisto del péptido R inhibidor de la fusión. Más preferiblemente, la glicoproteína de la envoltura viral que reconoce células B o células madre hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> es una glicoproteína de la envoltura de BaEV modificada en la que el dominio de cola citoplásmico está desprovisto del péptido R inhibidor de la fusión. Lo más preferiblemente, la glicoproteína de la envoltura viral que reconoce células B o células madre hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> es una glicoproteína de la envoltura del BaEV modificada que comprende o consiste en la secuencia SEQ ID NO: 23.

[0168] Para fines de transfección, dicho vector retroviral de transferencia, secuencias del segundo y tercer ácido nucleico pueden transportarse en un mismo vector, o en dos o tres vectores separados. Generalmente, un plásmido codifica el componente retroviral del centro de la partícula del vector viral. El origen de los genes gag y pol da nombre a la partícula vector viral. Por ejemplo, la expresión "partícula de vector derivada del VIH-1" normalmente indica que los genes gag y pol de la partícula del vector son los del VIH-1.

[0169] El término "transfección" significa la introducción de un ácido nucleico extraño (ADN, ADNc o ARN) en una célula de modo que la célula huésped exprese el gen o secuencia introducido para producir una sustancia deseada, normalmente una proteína codificada por el gen o secuencia introducido. El gen introducido puede incluir secuencias reguladoras o de control, tales como inicio, parada, promotor, señal, secreción u otras secuencias utilizadas por la maquinaria genética de una célula. Una célula huésped que recibe y expresa ADN o ARN introducido se ha "transfectado".

60 [0170] Para la producción de partículas de vector, se puede emplear cualquier célula que sea compatible con la expresión de genes retrovirales, en particular lentivirales, Gag y Pol, o cualquier célula que pueda modificarse para soportar dicha expresión. Por ejemplo, pueden usarse células productoras, tales como células 293T y células de insecto (en particular para vectores derivados de VIH), células TE 671 y HT1080 (en particular para vectores derivados de MLV).

65 [0171] La presente invención también se refiere a un kit que comprende:

- (i) el vector retroviral de transferencia de la invención definido en la sección "*Vector retroviral de transferencia*" anterior,  
(ii) un segundo ácido nucleico que comprende un ADNc que codifica proteínas centrales del mismo retrovirus que el vector retroviral (i), tal como se define anteriormente, y  
(iii) un tercer ácido nucleico que comprende un ADNc que codifica una glicoproteína de la envoltura viral que reconoce células B o células madre hematopoyéticas CD34<sup>+</sup>, tal como se define anteriormente.

[0172] El kit puede incluir además un material de empaquetamiento para el mismo.

[0173] El vector y los dos ácidos nucleicos pueden suministrarse en el mismo recipiente o en recipientes separados dentro del kit .

#### *Línea celular de empaquetamiento*

[0174] La presente invención también se refiere a una línea celular de empaquetamiento de virus estable que produce la partícula de vector viral pseudotipada condicional de la invención.

[0175] En el contexto de la invención, una línea celular de empaquetamiento de virus estable se refiere a una línea celular que expresa de manera estable los diferentes componentes de la partícula de vector viral pseudotipada de la invención. Normalmente, los ácidos nucleicos que codifican los diferentes componentes de la partícula de vector viral pseudotipada de la invención están integrados en el genoma de la línea celular.

[0176] En particular, dicha línea celular de empaquetamiento de virus estable puede ser cualquier célula que sea compatible con la expresión de genes retrovirales, en particular lentivirales, Gag y Pol, o cualquier célula que pueda modificarse para soportar dicha expresión. Por ejemplo, pueden ser células 293T, y se pueden usar células de insecto (en particular para vectores derivados de VIH), células TE 671 y HT1080 (en particular para vectores derivados de MLV).

#### *Aplicaciones terapéuticas*

[0177] La presente invención también se refiere a un medicamento que comprende:  
(i) una partícula de vector viral pseudotipada condicional según la invención,  
(ii) un plásmido que comprende el ácido nucleico multicistrónico o ácido nucleico según la invención,  
(iii) células madre hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> y/o células B transducidas con la partícula de vector viral pseudotipada condicional según la invención, o  
(iv) células madre hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> y/o células B transfectadas con un plásmido que comprende el ácido nucleico multicistrónico o el ácido nucleico según la invención, como principio activo.

[0178] También se refiere a una composición farmacéutica que comprende:  
(a1) una partícula de vector viral pseudotipada condicional según la invención,  
(a2) un plásmido que comprende el ácido nucleico multicistrónico o ácido nucleico según la invención,  
(a3) células madre hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> y/o células B transducidas con la partícula de vector viral pseudotipada condicional según la invención, o  
(a4) células madre hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> y/o células B transfectadas con un plásmido que comprende el ácido nucleico multicistrónico o el ácido nucleico según la invención,  
y (b) un portador farmacéuticamente aceptable.

[0179] La presente solicitud también describe un procedimiento para tratar una enfermedad en un sujeto que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de:  
(i) una partícula de vector viral pseudotipada condicional según la invención,  
(ii) un plásmido que comprende el ácido nucleico multicistrónico o ácido nucleico según la invención,  
(iii) células madre hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> y/o células B transducidas con la partícula de vector viral pseudotipada condicional según la invención, o  
(iv) células madre hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> y/o células B transfectadas con un plásmido que comprende el ácido nucleico multicistrónico o el ácido nucleico según la invención, al sujeto que lo necesita.

[0180] En el contexto de la presente invención, un "sujeto" indica 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 humano.

[0181] Como se usa en el presente documento, el término "portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a un portador que puede administrarse a un paciente, junto con una partícula de vector viral pseudotipada condicional según la invención, y no destruye la actividad farmacológica de la misma y no es tóxica cuando se administra en dosis suficientes para administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz de la partícula del vector viral.

[0182] Los portadores y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden usarse en las composiciones farmacéuticas de esta invención incluyen, entre otros, intercambiadores de iones, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, sistemas de administración de fármacos autoemulsionantes (SEDDS), tales como succinato de polietilenglicol 1000 de d- $\alpha$ -tocoferol, tensioactivos utilizados en formas de dosificación farmacéutica, tales como Tweens u otras matrices de administración poliméricas similares, proteínas séricas, tales 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 potásico, cloruro sódico, sales de zinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias a base de celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa sódica, poliácridatos, ceras, polímeros de bloque de polietileno-polioxipropileno, polietilenglicol y grasa de lana. También se pueden usar ventajosamente ciclodextrinas tales como  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -ciclodextrina, o derivados químicamente modificados, tales como hidroxialquilciclodextrinas, incluyendo 2- y 3-hidroxiopropil-ciclodextrinas, u otros derivados solubilizados para mejorar la administración de composiciones según la invención.

[0183] Se puede utilizar cualquier procedimiento de administración adecuado conocido por un experto en la técnica. En particular, la partícula de vector viral pseudotipada según la invención o las células transducidas o transfectadas pueden administrarse, por ejemplo, por vía parenteral (en particular mediante inyección intravenosa e inyección intrafémur (cavidad de la médula ósea)). Cuando se selecciona la ruta parenteral, las partículas del vector viral pseudotipadas pueden estar en forma de soluciones y suspensiones inyectables, acondicionadas en ampollas o matraces. Las formas para administración parenteral se obtienen convencionalmente mezclando las partículas de vector viral pseudotipadas según la invención con tampones, estabilizadores, conservantes, agentes solubilizantes, agentes isotónicos y agentes de suspensión. Según técnicas conocidas, estas mezclas pueden a continuación esterilizarse y acondicionarse en forma de inyecciones intravenosas. Un experto en la técnica puede utilizar tampones basados en sales de fosfato orgánico como tampón. Ejemplos de agentes de suspensión incluyen metilcelulosa, acacia y carboximetilcelulosa de sodio. Ejemplos de estabilizadores incluyen sulfito de sodio y metasulfito de sodio, y ejemplos de conservantes incluyen p-hidroxibenzoato de sodio, ácido sórbico, cresol y clorocresol.

[0184] El plásmido que comprende el ácido nucleico multicistrónico o el ácido nucleico según la invención se puede administrar habitualmente mediante electroporación, en particular después de la linealización.

[0185] La presente invención también se refiere a una composición de vacuna que comprende:  
 (a1) una partícula de vector viral pseudotipada condicional según la invención,  
 (a2) un plásmido que comprende el ácido nucleico multicistrónico o ácido nucleico según la invención,  
 (a3) células madre hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> y/o células B transducidas con la partícula de vector viral pseudotipada condicional según la invención, o  
 (a4) células madre hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> y/o células B transfectadas con un plásmido que comprende el ácido nucleico multicistrónico o el ácido nucleico según la invención,  
 y (b) un portador farmacéuticamente aceptable. La composición de vacuna de la invención puede comprender además un adyuvante.

[0186] La presente invención se refiere además a la partícula de vector viral pseudotipada condicional según la invención, un plásmido que comprende el ácido nucleico multicistrónico según la invención, células madre hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> y/o células B transducidas con la partícula de vector viral pseudotipada condicional según la invención, o células madre hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> y/o células B transfectadas con un plásmido que comprende el ácido nucleico multicistrónico según la invención, para su uso como vacuna.

[0187] También se divulga un procedimiento de vacunación de un sujeto que comprende administrar en un sujeto que lo necesita una cantidad profilácticamente eficaz de:

(i) una partícula de vector viral pseudotipada condicional según la invención,  
 (ii) un plásmido que comprende el ácido nucleico multicistrónico o ácido nucleico según la invención,  
 (iii) células madre hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> y/o células B transducidas con la partícula de vector viral pseudotipada condicional según la invención, o  
 (iv) células madre hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> y/o células B transfectadas con un plásmido que comprende el ácido nucleico multicistrónico o el ácido nucleico según la invención,

[0188] La presente invención se refiere además a la partícula de vector viral pseudotipada condicional de la invención, un plásmido que comprende el ácido nucleico multicistrónico según la invención, células madre hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> y/o células B transducidas con la partícula de vector viral pseudotipada condicional según la invención, o células madre hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> y/o células B transfectadas con un plásmido que comprende el ácido nucleico multicistrónico según la invención, para su uso como medicamento de inmunoprofilaxis vectorizada.

[0189] Se refiere además al uso de la partícula de vector viral pseudotipada condicional de la invención, un plásmido que comprende el ácido nucleico multicistrónico según la invención, células madre hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> y/o células B transducidas con la partícula de vector viral pseudotipada condicional según la invención, o células madre hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> y/o células B transfectadas con un plásmido que comprende el ácido nucleico multicistrónico

según la invención, para la fabricación de un medicamento destinado a la inmunoprofilaxis vectorizada.

[0190] La presente solicitud también describe un procedimiento para proporcionar inmunoprofilaxis vectorizada a un sujeto, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de la partícula de vector viral pseudotipada condicional de la invención, un plásmido que comprende el ácido nucleico multicistrónico según la invención, células madre hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> y/o células B transducidas con la partícula de vector viral pseudotipada condicional según la invención, o células madre hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> y/o células B transfectadas con un plásmido que comprende el ácido nucleico multicistrónico según la invención.

[0191] Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de una partícula de vector viral que confiere un efecto terapéutico al sujeto tratado. Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad de una partícula de vector viral que confiere un efecto profiláctico al sujeto tratado. El efecto terapéutico o profiláctico puede ser objetivo (es decir, medible mediante alguna prueba o marcador) o subjetivo (es decir, el sujeto da una indicación o siente un efecto). Como es conocido por el experto, las dosis eficaces variarán dependiendo de la vía de administración, el tamaño y/o peso del sujeto, así como la posibilidad de uso conjunto con otros agentes.

[0192] Cuando la partícula de vector viral pseudotipada se usa como medicamento y se administra a un sujeto en un procedimiento terapéutico, se prefiere la administración a través de la vía intravenosa o por la vía medular, en particular la vía medular del fémur o del húmero.

[0193] En una realización particular, la partícula de vector viral pseudotipada condicional de la invención, el plásmido que comprende el ácido nucleico multicistrónico o ácido nucleico según la invención, células madre hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> y/o células B transducidas con la partícula de vector viral pseudotipada condicional según la invención, o células madre hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> y/o células B transfectadas con un plásmido que comprende el ácido nucleico multicistrónico o el ácido nucleico según la invención, son para utilizar para tratar y/o prevenir una enfermedad infecciosa, una enfermedad inflamatoria o un cáncer.

[0194] La invención también se refiere al uso de la partícula de vector viral pseudotipada condicional de la invención, un plásmido que comprende el ácido nucleico multicistrónico o ácido nucleico según la invención, células madre hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> y/o células B transducidas con la partícula de vector viral pseudotipada condicional según la invención, o células madre hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> y/o células B transfectadas con un plásmido que comprende el ácido nucleico multicistrónico o el ácido nucleico según la invención, para la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento y/o la prevención de una enfermedad infecciosa, una enfermedad inflamatoria o un cáncer. Además, describe un procedimiento para tratar y/o prevenir una enfermedad infecciosa, una enfermedad inflamatoria o un cáncer en un sujeto, que comprende administrar una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de la partícula de vector viral pseudotipada condicional de la invención, un plásmido que comprende el sistema nucleico multicistrónico, ácido o ácido nucleico según la invención, células madre hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> y/o células B transducidas con la partícula de vector viral pseudotipada condicional según la invención, o células madre hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> y/o células B transfectadas con un plásmido que comprende el ácido nucleico multicistrónico o ácido nucleico según la invención, en un sujeto que lo necesite.

[0195] Como se usa en el presente documento, el término "enfermedad infecciosa" se refiere a una afección en la que un organismo o agente infeccioso está presente en una cantidad detectable en la sangre o en un tejido normalmente estéril o compartimento normalmente estéril de un sujeto. Los organismos y agentes infecciosos incluyen virus, micobacterias, bacterias, hongos y parásitos. Los términos abarcan infecciones agudas y crónicas, así como sepsis.

[0196] Como se usa en el presente documento, el término "cáncer" se refiere a una afección en la que células de origen huésped que se replican anormalmente están presentes en una cantidad detectable en un sujeto. El cáncer puede ser un cáncer maligno o no maligno. Los cánceres incluyen, entre otros, cáncer de vías biliares; cáncer de cerebro; cáncer de mama; cáncer de cuello uterino; coriocarcinoma; cáncer de colon; cáncer endometrial; cáncer de esófago; cáncer gástrico; neoplasias intraepiteliales; leucemias; linfomas; cáncer de hígado; cáncer de pulmón; melanoma; neuroblastomas; cáncer bucal; cáncer de ovarios; cáncer de páncreas; cáncer de próstata; cáncer de recto; cáncer de riñón; sarcomas; cáncer de piel; cáncer testicular; cáncer de tiroides; así como otros carcinomas y sarcomas. Los cánceres pueden ser primarios o metastásicos.

[0197] El anticuerpo de interés codificado por el ácido nucleico multicistrónico incluido en la partícula de vector viral pseudotipada condicional de la invención dependerá de la enfermedad infecciosa o cáncer a tratar o prevenir. Dichos anticuerpos de interés son bien conocidos por el experto.

*Procedimientos de transducción y transfección.*

[0198] La presente invención también se refiere al uso de la partícula de vector viral pseudotipada condicional según la invención o de un plásmido que comprende el ácido nucleico multicistrónico o el ácido nucleico según la invención para inducir la expresión fisiológicamente regulada del anticuerpo anclada a la membrana y/o secretado o quimera de interés por una célula B, tal como se define anteriormente, ex vivo.

[0199] En una realización preferida, la expresión de la forma anclada a la membrana del anticuerpo o quimera de interés se induce cuando la célula B es una célula B que expresa BCR.

5 [0200] En otra realización preferida, la expresión de la forma secretada del anticuerpo o quimera de interés se induce cuando la célula B es una célula B similar a una célula plasmática.

[0201] La presente invención se ilustrará con más detalle mediante las figuras y ejemplos siguientes.

**Breve descripción de las figuras**

10 [0202]  
**Figura 1:** Se generaron cuatro construcciones de vectores lentivirales que codifican la forma secretora o anclada a la membrana de AR3A-IgG1 (dirigida contra E2 de HCV) impulsada por el promotor de la cadena ligera de Ig (FEEK). Los genes de la cadena pesada (CH) y de la cadena ligera kappa (CL) de IgG1 constantes se fusionaron con las regiones variables de AR3A (VL y VH). La coexpresión de CH y VH se obtuvo mediante la introducción de las secuencias peptídicas de F2A. El vector FSS permite la expresión exclusivamente de la forma secretada de AR3A. El vector FAM0 impulsa la expresión de la forma de AR3A unida a la membrana. Los vectores FAM1 y FAM2 se diseñaron para la expresión de las formas de AR3A tanto secretadas como ancladas a la membrana. Para FAM1-LV, se introdujo una secuencia intrónica corta entre los exones CH3 y M1 y para FAM2-LV se incluyeron dos secuencias intrónicas cortas entre los exones CH3 y M1 y entre los exones M1 y M2, respectivamente.  
 LTR: repeticiones terminales largas; F: elemento flap de VIH-1; WRE: elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota. SA y SD: sitio aceptor y donante de empalme, respectivamente. pAS y pAM: secuencia de poliadenilación para las formas secretada y anclada a la membrana, respectivamente.  
**Figura 2:** tarjeta de plásmido del vector FAM1 descrito en el ejemplo.  
 15 **Figura 3:** tarjeta de plásmido del vector FAM2 descrito en el ejemplo.  
**Figura 4:** tarjeta de plásmido del vector FSS descrito en el ejemplo.  
**Figura 5:** tarjeta de plásmido del vector FAM0 descrito en el ejemplo.  
**Figura 6:** LV condicionales para la producción de anticuerpos AR3A que imitan la expresión natural de las dos formas distintas de inmunoglobulina (Ig), que está estrictamente controlada por mecanismos de corte y empalme alternativo y poliadenilación durante la linfopoyesis de células B.  
 20 **Figuras 7-10:** Evaluación de la expresión transgénica del anticuerpo IgG1 anti-E2 en la línea celular Namalwa de linfoma de Burkitt (BL) no secretora.  
 Se transdujeron células B de Namalwa con cada uno de los cuatro LV como se indica en una MOI de 10 a 20 y se recolectaron 5 días después de la transducción para el análisis de transferencia Western (Figura 7) y la expresión de la forma IgG1 unida a membrana (Figura 10 y Figura 9) y la forma secretada del anticuerpo AR3A (Figura 8).  
 25 **Figura 7 -** Se analizaron lisados de células completas mediante transferencia Western. Las proteínas se separaron en SDS-PAGE en condiciones reductoras y se sondaron con un anticuerpo policlonal (H+L) anti-IgG humana de cabra y anticalnexina. HCm: Forma de membrana de la HC de IgG1. HCs: forma secretada de la HC de IgG1. Se indican los tamaños aproximados de las diversas isoformas de cadena pesada.  
**Figura 8:** El porcentaje de células que expresan HC y1 (slgG1) en la superficie se determinó mediante análisis FACS ("gating" de LC Igk+ intracelular) (media  $\pm$  desviación estándar [DE],  $n \geq 9$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ ).  
**Figura 9 -** Niveles de IgG específicas anti-E2 secretadas en sobrenadantes de cultivo cuantificados mediante ELISA anti-E2 específico. La secreción de IgG1 anti-E2 en células B transducidas con la construcción de GFP y FAM0 no fue detectable de manera consistente (nd) (media  $\pm$  DE,  $n \geq 3$ ; \* $P \leq 0,05$ ).  
 30 **Figura 10 -** Análisis de citometría de flujo de células BL transducidas para la expresión intracelular y en superficie del anticuerpo anti-E2. Dado que la población de FSS probablemente muestra unión de la forma soluble al FcR CD32 (que se muestra en la Figura 7 donde las células transducidas por FSS no producen la banda de 62 KDa de la forma de membrana de IgG1), la puerta efectiva se desplazó teniendo en cuenta esta tinción de la superficie de fondo en FSS como control negativo para revelar claramente la forma de membrana de BCR (slgG1; tinción de membrana de HC de IgG1; cyk: tinción intracelular de la LC k).  
**Figuras 11-13:** Evaluación de la expresión del anticuerpo transgénico IgG1 anti-E2 en la línea de células B plasmocíticas U266. Las células de plasmocitoma humano U266 transdujeron los LV indicados pseudotipados con VSV-G a una MOI de 10 a 20 y se recogieron 5 días después de la transducción para su análisis.  
**Figura 11:** Análisis de citometría de flujo de células U266 transducidas para la expresión intracelular y superficial del anticuerpo anti-E2 (slgG1: tinción de membrana de HC de IgG1; cyk: tinción intracelular de LC k).  
**Figura 12:** Análisis estadístico de los porcentajes de células que expresan HC y1 (slgG1) según lo determinado mediante análisis FACS ("gating" LC Igk+ intracelular) (media  $\pm$  DE,  $n=7$ ; \*\* $P \leq 0,01$ ).  
**Figura 13:** Los niveles de IgG específicas anti-E2 secretadas en sobrenadantes de cultivo se cuantificaron mediante ELISA anti-E2 específico (normalización para 100% de transducción y número de células). La secreción de IgG1 anti-E2 en células B transducidas con la construcción GFP y FAM0 no fue detectable de manera consistente (nd) (media  $\pm$  DE,  $n \geq 6$ ; \*\* $P \leq 0,01$ ).  
 35 **Figuras 14-17:** La expresión de la forma unida a la membrana del anticuerpo transgénico IgG1 anti-E2 afecta ligeramente el patrón de expresión en superficie de la IgM endógena.  
**Figura 14:** Análisis FACS de IgM endógena a nivel intracelular (cyIgM) y expresión de HC y1 transgénica en la superficie celular (slgG1) de células Namalwa transducidas ("gating" de LC Igk+ intracelular).  
**Figura 15:** Porcentaje de IgM endógena intracelular (cyIgM) (barras negras,  $n \geq 16$ ) e IgM endógena anclada a la

membrana (sIgM) (barras grises, n≥10) (medias ± DE, \*\*P ≤ 0,01; \*\*\*P ≤ 0,001).

**Figura 16:** Niveles de expresión (MFI) de la IgM endógena intracelular (cyIgM) (barras negras, n≥7) y de la IgM endógena anclada a la membrana (sIgM) (barras grises, n≥13), en relación con los valores de FSS para los cuales MFI se estableció en 1 (media ± DE, \*\*\*\*P ≤ 0,0001).

5 **Figura 17:** Análisis FACS de la expresión de IgM endógena (sIgM) y de HC y1 transgénica (sIgG1) en la superficie celular para células Namalwa transducidas ("gating" de LC κ+ intracelular). Dado que la población FSS mostró tinción para la forma de HC a membrana, aunque las células transducidas con FSS no producen la banda de 62 KDa de la forma de membrana de HC y1, la puerta efectiva se desplazó en FSS como control negativo para revelar claramente la forma de membrana de BCR.

10 **Figuras 18-20:** Funcionalidad del BCR transgénico tras estimulación policlonal/Señalización por contraste de BCR IgM e IgG.

Las células transducidas se estimularon mediante entrecruzamiento de BCR anti-μ (**Figura 18**) o anti-γ (**Figura 19**) usando (Fab')<sub>2</sub> anti-IgM (BCR endógeno en **a**) o anti-IgG (BCR ectópico en la **Figura 19**) y se compararon con células no estimuladas. El nivel de fosforilación de BLNK-Y84 se muestra para células positivas para tinción kappa intracelular.

15 **Figura 20:** La estimulación se determinó mediante el aumento en el MFI de las muestras estimuladas en relación con las no estimuladas y se determinó la relación γ/μ (media ± DE, n≥4; \*\*\*P ≤ 0,001).

**Figuras 21-23:** Expresión *in vitro* del anticuerpo transgénico AR3A en células B primarias. Se purificaron células B CD19<sup>+</sup> a partir de sangre periférica de adultos y se transdujeron a una MOI de 10-15 con LV pseudotipados con gp de BAEV en presencia de IL2 y pansorbina en pocillos recubiertos con retronectina. El día 3, las células se lavaron y se cultivaron conjuntamente en MS5 en presencia de IL-2 e IL-15. Se recogieron los sobrenadantes del cultivo siete días después de la transducción y las células se analizaron mediante citometría de flujo para determinar la expresión de IgG1/κ.

20 **Figura 21:** HC y1 (sIgG1) y LC κ en superficie (tinción de células B CD19<sup>+</sup> primarias transducidas analizadas mediante citometría de flujo el día 7 después de la transducción (se muestra como un aumento del factor de multiplicación en comparación con las células no transducidas; los datos son representativos de 3 experimentos)

**Figura 22:** Expresión en superficie de HC y1 (sIgG1) y LC κ en células B (mostrada como un aumento del factor de multiplicación en comparación con las células no transducidas (media ± DE, n≥4; \*\*P ≤ 0,01).

**Figura 23:** Niveles de expresión de HC y1 anclada a membrana (sIgG1) en células transducidas expresados por el aumento del factor de multiplicación en MFI en comparación con células no transducidas (media ± DE, n≥4; \*P ≤ 0,05).

30 **Figuras 24-27:** Expresión *in vivo* del anticuerpo transgénico AR3A en ratones humanizados. Se injertaron ratones NSG de 7 semanas de edad mediante inyección IP de 4 x 10<sup>6</sup> células CD4<sup>+</sup> y 3 x 10<sup>6</sup> células CD19<sup>+</sup> transducidas con un vector que codifica GFP, vector FSS, FAM2 o FAM2. Los niveles séricos de IgG1 AR3A se midieron semanalmente a partir del día 7 después de la reconstitución.

35 **Figura 24:** Se evaluaron células B humanas esplénicas (CD45<sup>+</sup> CD19<sup>+</sup>) para determinar la expresión de IgG1 en superficie.

**Figura 25:** Cinética de la producción de anticuerpos séricos IgG1 humanos anti-E2 en ratones humanizados. Los resultados expresados en μg/ml representan la Media/DE de los valores experimentales recopilados de 4 a 8 ratones humanizados dependiendo del grupo (\*\*P ≤ 0,01; \*\*\*P ≤ 0,001). La producción de hIgG1 anti-E2 en ratones reconstituidos por células B transducidas con la construcción de GFP y FAM0 fue consistentemente indetectable (nd) (d14: barras negras, d21: barras grises).

40 **Figura 26:** Determinación del porcentaje de hIgG anti E2/IgG humana en sueros de ratón (d14: barras negras, d21: barras grises) (media ± DE, \*P ≤ 0,05).

**Figura 27:** Se utilizaron sueros de ratón para ensayos de neutralización con HCVcc en la línea celular HuH7. Las partículas de HCVcc se incubaron con sueros de ratón durante 1 hora a 37 °C antes de la infección por HuH7. Las células se lavaron 6 horas después y a continuación se subcultivaron durante 5 días (media ± DE, n≥6; \* 0,02).

45 **Figuras 28-30:** Expresión *in vitro* del anticuerpo transgénico AR3A en células B primarias transducidas con vectores lentivirales pseudotipados con las glicoproteínas del virus del sarampión o del virus endógeno del babuino (BaEV). Se purificaron células B CD19<sup>+</sup> a partir de sangre periférica de adulto y se transdujeron a una MOI de 10-15 con LV pseudotipados con gp de BAEV (BRL) o a una MOI de 1-10 con LV pseudotipados con gp (HF) del virus del sarampión (FSS, FAM2, FAMO), en la presencia de IL2 y pansorbina cultivadas en pocillos recubiertos con retronectina. El día 3, las células se lavaron y se cultivaron conjuntamente en células MS5 en presencia de IL-2 e IL-15. Se recogieron los sobrenadantes del cultivo siete días después de la transducción y las células se analizaron mediante citometría de flujo para determinar la expresión de IgG1/κ.

50 **Figura 28:** Expresión en superficie de HC de y1 (sIgG1) (activada en células CD19<sup>+</sup>) que se muestra como un aumento de veces en comparación con las células transducidas con FSS.

**Figura 29:** Expresión en superficie de HC de y1 (sIgG1) y LC κ en células B que se muestra como un aumento de veces en comparación con las células transducidas con FSS.

55 **Figura 30:** Tinción de HC de y1 (sIgG1) en superficie de células B CD19<sup>+</sup> primarias transducidas analizadas mediante citometría de flujo el día 7 después de la transducción. Paneles superiores (HF): las células se transdujeron con LV pseudotipados con gp de HF. Paneles inferiores (BRL): las células se transdujeron con LV pseudotipados con gp de BRL.

**Breve descripción de las secuencias**

65 [0203]

SEQ ID NO:	Descripción
------------	-------------

1	Motivo consenso de péptidos 2A
2	Péptido F2A
3	Secuencia que codifica el péptido F2A
4	Péptido T2A
5	Secuencia que codifica el péptido T2A
6	Péptido P2A
7	Secuencia que codifica el péptido P2A
8	Péptido E2A
9	Secuencia que codifica el péptido E2A
10	Secuencia optimizada de codones que codifica el péptido F2A
11	Secuencia optimizada de codones que codifica el péptido T2A
12	Secuencia optimizada de codones que codifica el péptido E2A
13	Secuencia consenso del sitio de escisión por furina
14	Sitio de escisión por furina
15	Secuencia que codifica el sitio de escisión por furina
16	Promotor MH
17	Promotor FEEK
18	Señal pAM
19	RRE
20	cPPT
21	WPRE
22	WPRE optimizado
23	Glicoproteína de envoltura de BaEV modificada
24	Secuencia del péptido F2Mfurina
25	Cebador F
26	Cebador R
27	Sonda
28	Cebador F de actina
29	Cebador R de actina
30	Sonda de actina
31	Secuencia típica de la secuencia B3
32	Secuencia típica de la secuencia B4

## Ejemplos

### Ejemplo 1

5 [0204] El presente ejemplo describe el diseño de los inventores del ácido nucleico multicistrónico de la invención y su uso para impulsar la expresión de una forma anclada a la membrana y/o una forma secretada de dicho anticuerpo de interés dependiendo de la etapa de maduración de la célula B en la que se incorporó.

### 10 Material y procedimientos

#### *Construcciones de plásmidos*

15 [0205] Las secuencias variables de cadena ligera y pesada de AR3A (Law et al. (2008) Nat. Med. 14:25-27) se amplificaron y se insertaron en dirección 5' de las regiones constante de cadena k y constante de IgG1 secretora humanas, respectivamente. Los dominios variables y constantes se unieron mediante el péptido F2A/furina de secuencia 5'-cgggctaagaga gcaccggtgaacagacttgaatttgaccttctcaagttggcgggagacgtggagtccaacccagggccc-3' (SEQ ID NO: 24) y se subclonaron en dirección 3' del promotor FEEK de secuencia SEQ ID NO: 17 en el vector FG12 descrito en Lois. et al. (2002) Science 295/868-872 para crear el vector FSS. Los inventores eliminaron el codón de parada del dominio CH3 de la versión secretora de IgG1 humana y unieron este dominio a los dominios transmembrana y citoplasmático M1 y M2 del BCR de IgG1 humana para crear el vector FAM0. Se insertaron secuencias intrónicas entre CH3 y M1 (vector FAM1) o entre CH3/M1 y M1/M2 (vector FAM2). Se añadió una secuencia de poliA sintética unidireccional (SPA-TB1) de secuencia SEQ ID NO: 18 después del codón de parada. Los vectores lentivirales llevaban el casete de expresión en orientación inversa para conservar los sitios de corte y empalme durante la producción del vector. Todos los vectores contienen estructuras lentivirales autoinactivantes de tercera generación. Las cadenas pesadas (HC) de IgG1 se optimizaron para limitar el corte y empalme inadecuado debido a sitios donantes y aceptores de corte y empalme crípticos. Las secuencias se analizaron con un algoritmo de predicción de corte y empalme *in silico* y se mutaron los potenciales sitios de corte y empalme.

### 30 *Producción y titulación de vectores lentivirales*

[0206] Los vectores lentivirales se generaron mediante transfección transitoria de células 293T. Para el pseudotipado

con la glicoproteína BaeV descrita en Girard-Gagnepain et al. (2014) Blood 124:1221-1231, se transfectaron 7 µg de plásmido de envoltura junto con un plásmido de empaquetamiento gagpol (8,6 µg) y un plásmido que codificaba un AR3A que expresa LV (8,6 µg). Para el LV pseudotipado con VSVg, se transfectaron 2,3 µg de plásmido de envoltura. Después de 18 horas de transfección, el medio se reemplazó con Optimem suplementado con Hepes (Gibco, Invitrogen) para LV pseudotipado con Baev o DMEM complementado con penicilina-estreptomina al 1 % y suero de ternera fetal (FCS) al 10 % para el LV pseudotipado con VSVg. Los sobrenadantes virales se recogieron 48 horas después de la transfección y se filtraron. La concentración a baja velocidad de los vectores BaEV se realizó mediante centrifugación durante la noche de los sobrenadantes virales a 3000 g a 4 °C. Los VSVg-LV se concentraron mediante ultracentrifugación con sacarosa al 20 % a 25.000 g durante 2 h a 4 °C. Los títulos infecciosos (TU/ml) se detectaron añadiendo diluciones en serie de los sobrenadantes a las células diana 293T, así como mediante análisis qPCR del número de copias del genoma viral el día 10 después de la transducción.

#### *Líneas celulares y protocolos de transducción*

[0207] Se cultivaron células IgM/λ Namalwa (linfoma de Burkitt BL subtipo PNT (ACC-69) adquiridas de DSMZ, Braunschweig, Alemania) y células U266 (plasmocitoma) en medio RPMI (Gibco, Invitrogen, Auckland, Nueva Zelanda) suplementado con 10% suero fetal de ternera y 50 µg/ml de penicilina/estreptomina. Se cultivaron 293T (células epiteliales de riñón humano) en medio DMEM (Gibco, Invitrogen) suplementado de la misma manera. Para la transducción, se sembraron  $3 \times 10^5$  células en placas de 48 pocillos y se transdujeron con pseudotipos de VSV-G-LV a una MOI de 10 a 20 para garantizar una eficiencia de transducción similar.

#### *Aislamiento y transducción de células T y B*

[0208] Se obtuvieron muestras de sangre de donantes adultos sanos después del consentimiento informado de acuerdo con la Declaración de Helsinki y se recogieron en dextrosa de citrato ácido. Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) en un gradiente de Ficoll (Abcys Eurobio, Francia). Las células B CD19<sup>+</sup> y las células T CD4<sup>+</sup> se aislaron mediante selección magnética negativa utilizando un kit de aislamiento de células B y un kit de aislamiento de células T CD4<sup>+</sup>, respectivamente (Miltenyi Biotec, París, Francia). La pureza de las células B y T aisladas se analizó utilizando anticuerpos anti-hCD19 y anti-hCD4, respectivamente, y se analizó mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (Cantoll; BD Biosciences, Le pont de Claix, Francia). Los donantes dieron su consentimiento para utilizar su muestra de sangre con fines de investigación, mediante depósito en el banco de tumores de los Hospices Civils de Lyon, aprobado por la ley de ética francesa.

[0209] Para la transducción *in vitro* de células B primarias, las células se cultivaron en RPMI y se preestimularon durante 3-4 horas con 50 ng/ml de IL2 (Miltenyi Biotec) y pansorbina 200 ng/ml (Millipore calbiochem, Molsheim, Francia), seguido de transducción a las MOI indicadas (10-20). Tres días después de la transducción, las células B se subcultivaron con células alimentadoras MS5 en presencia de IL2/IL15 (100 ng/ml) (Miltenyi Biotec).

[0210] Para los experimentos de transferencia adoptiva, se sembraron inmediatamente células B para la transducción en medio RPMI (Invitrogen) suplementado con FCS al 10 % en presencia de 50 ng/ml de IL2 y 200 ng/ml de pansorbina. Las transducciones se realizaron durante la noche con los BaEV-LV a una MOI de 10. Las células T CD4<sup>+</sup> se mantuvieron en medio RPMI suplementado con suero fetal de ternera (FCS) al 10 % y 20 ng/ml de IL-7 durante la noche (Miltenyi Biotec).

#### *ELISA*

[0211] Se analizaron sobrenadantes de cultivos de líneas celulares o sueros de ratón utilizando el conjunto de cuantificación de ELISA con IgG humana (Byl, Montgomery, EE. UU.), según las instrucciones del fabricante. El ELISA anti-E2 específico fue descrito en Garrone et al. (2011) Sci. Transl. Med. 3:94ra71. Se produjeron proteínas solubles de VHC-E2 mediante transfección de secuencias codificantes de plásmido phCMV de VHC-E2, fusionadas en su extremo C a secuencias de RGS-6x etiquetas de histidina. El umbral fue de aproximadamente 7 ng/ml.

#### *Ensayos de neutralización de partículas virales HCVcc*

[0212] Se descomplementaron sueros de ratón durante 1 hora a 56 °C. Se incubaron partículas de HCVcc del genotipo JC1 en diferentes sueros de ratón (diluciones 1/20 y 1/40), antes de la infección de células Huh 7.5. La inhibición de la infección mediada por anticuerpos se determinó para cada suero cuantificando las unidades formadoras de focos por ml (UFF/ml) mediante inmunohistoquímica, controlando el efecto negativo conocido del suero murino sobre la infección.

#### *Reconstitución de ratones inmunodeficientes*

[0213] Se alojaron ratones inmunodeficientes NOD Scid<sup>-/-</sup> γc<sup>-/-</sup> (NSG) en el PBES (Plateau de Biologie Expérimentale de la Souris), Lyon, Francia. Los experimentos se realizaron de acuerdo con las directrices de la Unión Europea tras la aprobación de los protocolos por parte del comité de ética local (Acuerdo de autorización C2EA-15: Comité d'Évaluation Commun au Centre Léon Bérard, à l'Animalerie de transit de l'ENS, au PBES et au laboratoire P4, Lyon,

Francia. A adultos NSG (6-8 semanas de edad) se les inyectó por vía intraperitoneal  $3 \times 10^6$  células B primarias humanas modificadas y  $4 \times 10^6$  células T CD4<sup>+</sup> primarias humanas simultáneamente. Se recogieron muestras de sangre semanalmente para análisis FACS y ELISA. El fenotipado celular en el bazo de estos ratones se realizó después de la preparación de la suspensión celular.

5

*Análisis de citometría de flujo*

[0214] Para el análisis FACS, se usaron anticuerpos monoclonales conjugados con PE, APC, PeVio770, VioBlue, VioGreen, mAb anti-humano acoplado a (VIT4)-APC dirigido a los siguientes marcadores de superficie celular: IgM-APC (clon PJ2-22H3), IgG1-PE (clon IS11-12E4.23.20), Kappa-Vio770 (clon IS11-24D5), CD19-PEVio770 (clon LT-19), CD45VioGreen (clon 5B1), de Myltenyi Biotech.

10

[0215] Todas las etapas de lavado e incubación se realizaron en PBS que contenía FCS al 2 %.

15

[0216] El análisis de citometría de flujo se realizó utilizando un software FACScanto II y Diva para la adquisición (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, Mountain View, CA) y el software FlowJo (Treestar, Ashland, OR) para el análisis.

20

*Aislamiento de ADN y determinación del número de copias mediante qPCR/RT-PCR*

[0217] Se extrajo ADN genómico de la suspensión de células individuales utilizando el kit Nucleospin Blood (Macherey-Nagel, Düren, Alemania) según las instrucciones del fabricante, y se resuspendió en 60 µl del tampón de elución suministrado. La PCR cuantitativa (qPCR) se realizó utilizando la mezcla maestra aplicada (life technology) en un sistema StepOnePlus (Applied Biosystem, CA, EE. UU.). Cebadores específicos para la detección de LV integrado utilizados: Cebador F de secuencia 5'-tgt gtc ccc gtc tgt tgt gt-3' (SEQ ID NO: 25), Cebador R de secuencia 5'-gag tcc tgc gtc gag aga gc-3' (SEQ ID NO: 26), Sonda de secuencia 5'-cag tgg cgc ccg aac agg ga-3' (SEQ ID NO: 27). Cebador específico para actina humana: Cebador F de secuencia 5'-tcc gtc tgg atc ggc ggc tcc a-3' (SEQ ID NO: 28), Cebador R de secuencia 5'-ctg ctt get gat cca cat ctg-3' ( SEQ ID NO: 29), Sonda de secuencia 5'-cct ggc etc gct gtc cac ctt cca-3' (SEQ ID NO: 30).

25

30

*Estimulación de la señalización de BCR*

[0218] Al menos 45 minutos antes de la estimulación, se hicieron alícuotas de  $3 \times 10^5$  células en 100 µl de PBS-BSA al 0,5 % en tubos de citometría de flujo y se equilibraron a 37 °C en un baño de agua. Después del equilibrio, las células se estimularon con una concentración final de 30 µg/ml de cada una de las inmunoglobulinas F(ab')<sub>2</sub>. El entrecruzamiento de los receptores de células B se realizó utilizando F(ab')<sub>2</sub> policlonales anti-IgM y anti-IgG de cabra (Southern Biotech, Alabama, EE.UU.).

35

[0219] Durante la señalización, las células se incubaron 10 minutos a 37°C para permitir que se produjera la transducción de señales y la fosforilación. Para determinar los niveles basales de fosforilación, las células no estimuladas se mantuvieron en paralelo con las células estimuladas. La fijación y la citometría de flujo fosfoespecífica intracelular se realizaron utilizando el kit de exposición perfix (Beckman coulter, California, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para la detección se utilizó anti BLNK-pY84 (AlexaFluor647, BD, clon J117-1278). Las muestras se almacenaron a 4 °C hasta la tinción para citometría de flujo.

40

45

*Transferencia Western*

[0220] La extracción de proteínas se realizó con tampón Ripah y se sometieron a electroforesis cantidades iguales de proteínas en geles de SDS-PAGE al 8 % en condiciones no reductoras. El análisis de transferencia Western se realizó con un anticuerpo anticalnexina (SPA-860, Stressgen Biotechnologies Corp, Canadá) y una cadena pesada anti-IgG (LsBio60606, Cliniscience, Francia).

50

*Análisis estadístico*

[0221] El análisis estadístico se realizó utilizando una prueba t de Student pareada. Para el ensayo de neutralización del HCvcc con suero de ratón, el análisis estadístico se realizó mediante una prueba de Mann Whitney.

55

Resultados

[0222] El objetivo de los inventores fue producir un vector lentiviral (LV) que expresa condicionalmente tanto la forma secretada como la anclada a la membrana de una inmunoglobulina transgénica (Tg-Ig), de una manera regulada por el estado de maduración de las células B transducidas. Para ello, se construyeron varias variantes del LV que incorporaban mecanismos alternativos de corte y empalme y poliadenilación regulados por la maquinaria celular. Estas

60

65

variantes se representan en la **Figura 1**. Se unieron las regiones variables y constantes de la cadena pesada  $\lambda 1$  (HC) y la cadena ligera  $\kappa$  (LC) del anticuerpo AR3A a través de un péptido "salto de ribosomas" de furina/F2A para permitir la coexpresión de ambas subunidades. El promotor específico de las células B FEEK se introdujo en los LV para permitir la regulación nativa de la expresión génica en las células B diana. Como las secuencias intrónicas naturales representaban más de 1 kb de la secuencia de Ig, los inventores las recortaron para evitar la disminución de los títulos virales evitando así la pérdida del reconocimiento de intrones.

[0223] Para imitar la expresión natural de Igs secretadas y expuestas en la superficie, los inventores diseñaron dos vectores de expresión condicional, FAM1 y FAM2. Las tarjetas de plásmidos de estos vectores están representadas respectivamente en las **Figuras 2 y 3**. En estos LV, se insertaron las secuencias intrónicas mínimas del gen de HC y1 que contienen tanto el corte y empalme y señales de poliadenilación de su exón terminal 3', así como las regiones codificantes transmembrana M1 y M2 de secuencia. En el LV FAM1, el intrón se introdujo entre los exones fusionados M1M2, que codifican el dominio transmembrana de Ig, y el exón CH3, mientras que en el LV FAM2, se introdujo una secuencia intrónica adicional entre los exones M1 y M2. Es importante destacar que ambos casetes de expresión se clonaron en orientación inversa en el vector para evitar la escisión de intrones durante la producción de LV. Los inventores también diseñaron dos LV adicionales: el vector FSS, que expresa solo la forma secretada de AR3A, y el vector FAM0, que codifica exclusivamente la forma anclada a la membrana del mismo anticuerpo AR3A (Ab). En este último vector, las regiones codificantes de los dominios transmembrana M1 y M2 de la cadena pesada de IgG1 se fusionaron directamente al dominio CH3. Las tarjetas de plásmidos de estos vectores están representadas respectivamente en las **Figuras 4 y 5**.

[0224] En las células transducidas, los inventores esperaban que la forma anclada a la membrana de Ab AR3A se expresara por células transducidas con FAM0, mientras que la forma secretada por células transducidas con FSS. Además, como las células de linfoma de Burkitt (BL) tienen un fenotipo de células B maduras, las células BL transducidas con FAM1 o FAM2 condicional deberían expresar la forma anclada a la membrana, mientras que en las células plasmáticas se espera lo contrario, es decir, los LV FAM1 y FAM2 deberían mediar la expresión predominante de la forma secretada. La expresión condicional de cualquiera de la forma anclada a la membrana (en células B maduras) frente a la forma secretada (en células plasmáticas) del vector lentiviral integrado en el ADN de la célula huésped se esquematiza en la **Figura 6**.

*Los LV median la expresión condicional de formas de anticuerpos secretados y anclados a la membrana*

[0225] Para investigar si estos vectores fisiológicamente regulados mediaban la expresión de las formas secretadas y ancladas a la membrana del ab AR3A, los inventores primero transdujeron la línea celular de linfoma de Burkitt (BL) con las diferentes construcciones de LV. Estas células se detienen en una etapa de diferenciación de células B maduras y expresan Igs endógenas unidas a membrana constituidas por la asociación de la cadena pesada  $\mu$  con cadenas ligeras  $\lambda$  formando una molécula de IgM completa. Se demostró que el subtipo PNT de las células Namalwa de BL también es capaz de secretar algunas IgM además de la forma predominante anclada a la membrana. Esto indica que dichas células de BL deberían estar operativas para procesar las construcciones para la expresión selectiva de la forma anclada a la membrana de la Ig transgénica. Además, el BCR endógeno de esta línea celular perteneciente al isotipo IgM, no debería interferir con la detección de la IgG1/ $\kappa$  transgénica.

[0226] Se evaluaron la expresión y secreción de Ig AR3A en sobrenadantes y células mediante transferencia Western y Elisa, cinco días después de la transducción (**Figuras 7, 8 y 9**). Se usó citometría de flujo para monitorizar la expresión en la membrana del transgén usando Abs anti-IgG1 (**Figura 10**).

[0227] Para caracterizar en primer lugar la expresión de la cadena pesada de IgG y1 transgénica impulsada por cada construcción, las proteínas de lisados de células completas de células transducidas se separaron en geles SDS-PAGE en condiciones reductoras y se sometieron a análisis de transferencia Western para HC y humana. La adición de los dominios M1 y M2 a la proteína HC da como resultado que la HCm (es decir, la forma anclada a la membrana de la cadena pesada de Ig) es más grande que las HC (es decir, la forma secretada de la cadena pesada de Ig) para todos los isotipos de Ig. Como se esperaba, solo se detectaron fácilmente HC en los lisados celulares transducidos con FSS, mientras que HCm fue la única forma detectable en los lisados celulares transducidos con FAM0 (**Figura 7**). La transducción de células Namalwa de BL con el vector FAM1 no impulsó la expresión de HCm, sino solo de HC, lo que sugiere que algunas señales de poliadenilación y corte y empalme están carentes o no son funcionales en esta construcción, lo que impide la maduración a la forma HCm. Curiosamente, se detectaron isovariantes tanto de HCm como de HC cuando las células se modificaron con el vector condicional FAM2 (**Figura 7**). Cabe destacar que también se detectaron isoformas de HC en líneas de células B maduras, tal como lo describen Price et al. (2009) J. Immunol. Methods 343:28-41.

[0228] Por lo tanto, se detectaron expresiones de Ig tanto de membrana como secretadas en células BL transducidas con FAM2. A pesar del hecho de que la producción de la forma HCm más larga es más difícil de obtener que la de la forma corta HCm debido a la presencia de la secuencia intrónica y eventos de empalme y considerando que las células BL necesitan procesar su propia Ig IgM endógena, la relación HCm/HC obtenida con el LV FAM2 parecía ser buena.

[0229] Se obtuvieron altas eficiencias de transducción (>97%) para cada vector, según lo evaluado mediante tinción

intracelular para la cadena ligera  $\kappa$  transgénica, aunque el nivel de expresión (MFI) de la cadena ligera  $\kappa$  fue menor en las células transducidas por FAM2 y FAM0 que en células modificadas con FSS (**Figura 10**). Esto podría explicarse por una diferencia en la estabilidad del ARN del LV debido a la presencia de la secuencia WPRE estabilizadora del ARN, que solo está presente en el ARN viral de FSS.

[0230] Curiosamente, los inventores detectaron la expresión en superficie de HC y1 (IgG1 de superficie) en las células transducidas con diferentes intensidades, dependiendo del diseño del vector (**Figuras 10 y 8**). Sin embargo, aunque este vector expresa solo la forma secretada del anticuerpo, se detectó cierto nivel de HC y1 en la superficie en células BL transducidas con LV FSS. El hecho de que las células transducidas con FSS no expresen la forma de Ig anclada a la membrana (**Figura 7**) indicó que el desplazamiento global en los niveles de expresión de HC y1 en la superficie en toda la población de células transducidas no se debió a la expresión de una forma de BCR adecuada, a diferencia de las células transducidas con el vector FAM0. De hecho, las células de BL Namalwa expresan el receptor Fc (FcR) CD32, que tiene una alta afinidad por el subtipo IgG1. Por lo tanto, los inventores consideraron que la detección de y1 en la superficie de las células transducidas probablemente se debe a la unión del Ab AR3A secretado a CD32. En comparación con el LV FSS, las células BL transducidas con LV FAM1 no expresaron de manera detectable IgG1 en la superficie (**Figura 10**), de concordancia con los resultados de la **Figura 7**. Es importante destacar que LV FAM2 indujo la expresión de IgG1 transgénica en la superficie celular de una manera equivalente a la obtenida con el vector control FAM0, que codifica exclusivamente una forma de IgG1 anclada a membrana.

[0231] Los inventores descubrieron que los niveles de Ab AR3A anclados a la membrana celular detectados a partir de las diferentes construcciones del LV estaban inversamente correlacionados con la secreción del anticuerpo en el sobrenadante, tal como se determinó con un ELISA anti-E2 específico (**Figura 9**). No se detectó Ab AR3A en el sobrenadante de las células transducidas con el LV FAM0 que expresa la forma BCR, mientras que las células transducidas con el vector FSS expresaron los niveles más altos de AR3A secretado ( $125 \pm 65$  ng/ml). Curiosamente, la citometría de flujo y el análisis ELISA demostraron que el LV FAM2 expresaba preferiblemente la forma anclada a la membrana de AR3A ( $23 \pm 7\%$ , **Figura 8**) similar al LV de control FAM0 ( $27 \pm 9\%$ , **Figura 8**), pero producía menos de la forma soluble ( $8,1 \pm 2,8$  ng/ml, en comparación con  $132 \pm 80$  ng/ml obtenido con el LV de control FSS, **Figura 9**). Esto era de esperar, ya que BL Namalwa tienen un fenotipo de células B maduras y no expresan el aparato secretor desarrollado de PC.

[0232] A continuación, los inventores transdujeron las células de plasmocitoma U266 que representan una etapa tardía de maduración de células B y que tienen un fenotipo IgE/ $\lambda$ . A diferencia de las células BL, las células U266 modifican preferiblemente el ARNm de Ig para expresar formas secretadas de Ig y no procesan formas de Ig ancladas a la membrana.

[0233] Es importante destacar que las células U266 transducidas con todos los LV expresaron un nivel bajo de IgG1 AR3A en la superficie celular (es decir, menos del 4 %, **Figuras 11 y 12**), tal como se esperaba para las células de plasmocitoma debido a la ausencia del coreceptor de BCR Ig $\alpha$  e Ig $\beta$  necesario para la exportación a la superficie celular. Además, debido al hecho de que estas células U266 no expresan el receptor Fc CD32, no se observó unión a la superficie celular de la forma secretada de Ab AR3A inducida por LV FSS y FAM1, a diferencia de las células BL. Consistentemente, a diferencia de las células BL, los inventores detectaron fácilmente el anticuerpo IgG1 anti-E2 en el sobrenadante de células U266 transducidas con vectores condicionales LV FAM2 ( $125 \pm 65$  ng/ml) (**Figura 13**). En particular, de acuerdo con el fenotipo de células plasmáticas de las células U266, la transducción por LV FAM2 de las células U266 dio como resultado una expresión preferencial de la forma secretada en comparación con la forma BCR en superficie ( $23,6 \pm 7,5$  % frente a  $3,6 \pm 1,8$  %, **Figura 12**) y se detectó 16 veces más Ab AR3A secretado en células U266 transducidas con FAM2 en comparación con células BL ( $125 \pm 65$  frente a  $8,1 \pm 2,8$ , **Figura 13**).

[0234] En conjunto, estos resultados indicaron que las secuencias reguladoras de corte y empalme y poliadenilación en el LV FAM2 (entre CH3 y el dominio M1 y entre los dominios M1 y M2), en asociación con la maquinaria celular involucrada en la secreción o exportación del BCR en la superficie celular, permiten la producción de formas secretadas y ancladas a la membrana de Ig AR3A dependiendo del estado de maduración de las células B.

#### *La expresión transgénica de AR3A-BCR solo afecta débilmente la expresión de Ig endógena*

[0235] Una preocupación relacionada con la expresión ectópica de Abs es el cambio potencial en la regulación o expresión de anticuerpos endógenos, que puede cambiar el estado de maduración de las células o puede conducir a trastornos autoinmunes o pérdida de reactividad inmune. Por lo tanto, los inventores evaluaron las consecuencias de la expresión ectópica de Ab AR3A sobre la expresión endógena de Ig en células Namalwa de BL transducidas con LV.

[0236] Curiosamente, el nivel intracelular de HCm endógena no se vio afectado, considerando tanto el porcentaje de células IgM+ intracelulares (cyIgM) (**Figuras 14 y 15**, barras negras) como la intensidad de expresión de IgM (**Figura 16**, barras negras). El análisis de la expresión endógena de HC de IgM (sIgM) de superficie en células BL transducidas reveló una débil modificación de la expresión de la HC de IgM endógena. De hecho, tanto el porcentaje de células IgM positivas en la superficie (**Figuras 17 y 15**, barras grises) como los niveles de expresión de IgM en la superficie (**Figuras 17 y 16**, barras grises) detectados tras la transducción con los vectores FAM2 o FAM0 se redujeron aproximadamente

un 20% en comparación con los obtenidos con LV FSS o FAM1.

[0237] En conjunto, estos resultados sugirieron que el tráfico intracelular y los niveles de expresión del BCR endógeno solo se vieron afectados débilmente por la expresión ectópica de un BCR transgénico.

*La estimulación del BCR ectópico expresado por células transducidas con LV FAM2 desencadena la señalización de BCR*

[0238] Debido a que un objetivo de los inventores era generar células B que expresan el transgén de Ig que pueda impulsar la maduración de las células B en células secretoras de Ab, probaron la funcionalidad de la forma anclada a la membrana de las construcciones de Ig. Eligieron monitorizar la fosforilación de la tirosina Y84 del adaptador BCR BLNK proximal, uno de los elementos más proximales al receptor de la vía de señalización de BCR. Para amplificar esta señal, buscaron acoplar el BCR en las células B primarias con los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> de Abs policlonales anti-IgM frente anti-IgG. Dicho Ag sustituto permitió un alto grado de entrecruzamiento del BCR transgénico, en comparación con el inducido por Ag E2, y la comparación del rendimiento de señalización del acoplamiento del BCR transgénico o endógeno. La fosforilación de BLNK se detectó en células transducidas con LV que expresan Ig, así como en células no transducidas después de la estimulación del BCR endógeno de IgM (Figura 18). Esto indicó que el BCR endógeno permaneció funcional, en concordancia con su regulación negativa solo débil de la superficie celular tras la transducción por LV.

[0239] Es importante destacar que la señalización a través del BCR expresado ectópicamente se produjo sólo en las células transducidas con FAM2 y FAMO después de la estimulación por un F(ab')<sub>2</sub> anti-IgG (Figura 19). La relación entre la fosforilación de BLNK-Y84 bajo estimulación anti-IgG en comparación con la estimulación anti-IgM fue significativamente mayor con las células transducidas con FAM2 y FAMO, es decir, 38 % y 47 %, respectivamente, en comparación con las células no transducidas (Figura 20).

[0240] En conjunto, estos resultados demostraron que el LV FAM2 permite la expresión de una forma BCR funcional de la IgG1 transgénica.

*El vector FAM2 permite la expresión de una forma anclada a la membrana de la IgG1 transgénica en células B humanas primarias*

[0241] A continuación, los inventores evaluaron la expresión de IgG en células B humanas primarias. Por lo tanto, utilizaron LV pseudotipados con envoltura de BaEV, que pueden transducir fácilmente células B humanas tanto inactivas como estimuladas por BCR. Transdujeron células B CD19<sup>+</sup> primarias humanas purificadas con los LV FSS, FAMO, FAM1 y FAM2 para investigar la producción de las dos formas activas de Ab AR3A *ex vivo*. Las células B primarias se transdujeron a una MOI de 10 con cada vector y se cultivaron adicionalmente durante 7 días en células del estroma MS5. Durante el cultivo, las células conservaron un fenotipo de células B maduras CD19<sup>+</sup> CD20<sup>+</sup> sin diferenciación en PC.

[0242] La eficacia de transducción de estas células osciló entre el 30 y el 52 % usando un LV de control que expresaba GFP. Los inventores encontraron un aumento significativo y reproducible en el porcentaje de células que expresaban IgG1/k en superficie después de la transducción por los LV FAM2 (5,75 %) y FAMO (5,12 %), en comparación con las células no transducidas (2,37 %) o con las células transducidas con los LV FSS (2,63 %) o FAM1 (2,43 %) (Figuras 21 y 22). Además, el MFI de HC y1 en la superficie celular aumentó significativamente con los LV FAMO y FAM2 (Figura 23) en comparación con las células no transducidas o con las células transducidas con LV FSS LV y LV FAM1. Estos resultados indicaron que el vector condicional FAM2 permite la expresión de la forma BCR de la IgG AR3A transgénica en una fracción de células B humanas primarias. El AR3A soluble se cuantificó a 10,45 ng/ml (media ± 0,65) en el sobrenadante de las células transducidas con LV FSS, pero estaba por debajo del límite de detección para las células transducidas con LV FAMO o LV condicionales FAM1 o FAM2. Esto era de esperar ya que el fenotipo de células B maduras de estas células se correlaciona con la producción preferencial de Ig de superficie.

*La transferencia adoptiva de células B transducidas con LV FAM2 induce anticuerpos neutralizantes in vivo.*

[0243] Para demostrar adicionalmente la capacidad de la construcción de FAM2 para impulsar la expresión tanto de la forma de membrana como de la forma secretada del transgén de Ig, los inventores analizaron la secreción del Ab AR3A por la progenie de células plasmáticas de células B humanas transducidas con las diferentes construcciones.

[0244] Las células B humanas pueden diferenciarse en células plasmáticas (PC) mediante transferencia adoptiva de células B CD19<sup>+</sup> y células T CD4<sup>+</sup> autólogas en ratones inmunodeficientes. Los inventores utilizaron el modelo de ratón NOD/SCID<sub>γ</sub><sup>-/-</sup> (NSG), que ha demostrado ser adecuado para el estudio de la producción de Ig humana (Hasui et al. (1994) Clin. Exp. Immunol. 95:357 -361; Martensson et al. (1995) Immunology 86:224-230). Los inventores transdujeron células B humanas purificadas con los LV FSS, FAMO y FAM2 e indujeron su diferenciación mediante transferencia adoptiva en ratones NSG. En este contexto, las células B se activan y diferencian en PC bajo la señal de activación policlonal desencadenada por el xenoinjerto, posiblemente consecutiva a la activación masiva de células T CD4<sup>+</sup> humanas por los xenoantígenos de ratón. Esto permitió a los inventores inducir la expresión de Ab AR3A tras

la maduración *in vivo* de células B transducidas con LV en plasmocitos, inducida por esta reacción xenogénica.

[0245] Las células B CD19<sup>+</sup> humanas constituían el 20-30% de las células en bazos de ratón, independientemente del LV usado para transducir estas células. Es importante destacar que los inventores observaron un aumento significativo en la subpoblación de células B CD19<sup>+</sup> IgG1<sup>+</sup> en ratones injertados con células B transducidas con LV FAM2 y FAM0 en comparación con ratones injertados con células no transducidas o modificadas con FSS (**Figura 24**, donante B). Estos resultados confirmaron los datos *in vitro* obtenidos con células B primarias y demostraron que el vector condicional FAM2 permite la expresión de la forma BCR de la IgG AR3A transgénica en células B humanas *in vivo*.

[0246] El plasma sanguíneo de los ratones injertados se recogió semanalmente y se evaluó mediante ELISA para determinar la presencia de IgG humana total y de anticuerpos específicos de E2 del VHC (es decir, Ab AR3A). Tal como se esperaba, no se detectó Ab AR3A secretado en el plasma de ratones injertados con células no transducidas o con células transducidas por el LV FAM0 (**Figura 25**). Es importante destacar que el Ab AR3A se detectó fácilmente en plasma de ratones injertados con células B humanas transducidas con LV FSS y FAM2 (2,45 ± 1,18 µg/ml y 0,81 ± 0,85 µg/ml, respectivamente). Como se esperaba, los ratones injertados con células B humanas transducidas con el LV FSS produjeron las mayores cantidades de anticuerpo AR3A. Los anticuerpos AR3A comprendieron un porcentaje bajo de hulgG total (0,02 %) en sueros de ratón el día 21 después de la transferencia con células transducidas con LV FAM2 (**Figura 26**), lo que representa la expresión basal de IgG1 transgénica sin activación específica de células B modificadas. Se esperaba este nivel basal de secreción de IgG transgénica en ausencia de una amplificación específica de antígeno del conjunto de células B modificadas que expresaban la forma anclada a la membrana.

[0247] Finalmente, para garantizar que el Ab AR3A secretado presente en los sueros de ratón fuera funcional, los inventores realizaron un ensayo de neutralización *in vitro* utilizando partículas de HCVcc. Descubrieron que la infección por HCVcc de células de hepatoma Huh-7.5 se neutralizaba significativamente con sueros de ratón que contenían anticuerpo AR3A secretado (intervalo de concentración final de AR3A en sueros de ratón: 0,06 - 1 µg/ml) en comparación con una baja inhibición inespecífica de HCVcc por suero negativo en AR3A (**Figura 27**), probablemente debido a la presencia de inhibidores derivados del suero.

[0248] En conjunto, estos datos demuestran que las células B modificadas con FAM-2 pueden expresar la forma unida a membrana y secretar la forma activa soluble del Ab neutralizante de ARA3 *in vivo*.

#### Discusión

[0249] Este ejemplo describe el primer vector lentiviral que permite la expresión de una forma fisiológicamente activa de un Ab monoclonal humano empleando el mecanismo natural de maduración de Ig durante el desarrollo de células B. Estos datos proporcionan herramientas atractivas para la inmunoterapia activa contra enfermedades infecciosas y antígenos tumorales.

[0250] Estudios anteriores han utilizado una variedad de enfoques para expresar la forma anclada a la membrana y/o secretada del mismo Ab humano en células B o no B. Sin embargo, en estos estudios, los niveles relativos de cualquiera de las formas permanecieron constantes y no pudieron cambiarse según la maduración de las células B. En el presente ejemplo, el enfoque utilizado implica la modificación de células B humanas por LV que inducen la expresión de Ig de una manera fisiológicamente adaptable.

[0251] Reproducir la regulación fisiológica de la expresión de Ig y el procesamiento de ARNm en el contexto de un vector lentiviral es un desafío. Los intentos anteriores de producir anticuerpos contra el VIH sólo lograron este objetivo parcialmente. Por lo tanto, la capacidad de utilizar la regulación natural del procesamiento del pre-ARNm de Ig es un gran paso adelante en el campo de la inmunoterapia. En particular, en el contexto de vectores lentivirales, el uso de mecanismos de corte y empalme y poliadenilación para obtener la expresión fisiológica de formas tanto ancladas a membrana como secretadas de Igs humanas no ha tenido éxito hasta el momento (Yu et al. (2012) PLoS One 7:e50438). Alternativamente, este estudio utilizó péptidos F2A autoescindibles mutados para modular la relación entre la Ig secretada y la unida a la membrana, que, sin embargo, sigue siendo independiente del estado de maduración de las células B.

[0252] En este caso, los inventores proporcionaron pruebas de que las células B pueden modificarse satisfactoriamente para expresar ambas formas de Ig transgénicas dependiendo del estado de maduración de las células B mediante el uso de señales de poliadenilación y corte y empalme alternativo mínimas requeridos. En general, los inventores demostraron que la expresión de Ig de un lentiviral FAM2 respondía bien a la maquinaria secretora y de exportación específica de estas células.

[0253] Lograr la transferencia de genes a largo plazo en células B humanas primarias ha sido notoriamente difícil porque la glicoproteína de la envoltura G de VSV clásica utilizada para producir LV pseudotipados no es eficiente. Por lo tanto, se desarrollaron LV pseudotipados con una glicoproteína de envoltura derivada del virus endógeno del babuino (BaEV), que permite la transducción eficiente de células B humanas en reposo y estimuladas por BCR. La combinación de este pseudotipo de envoltura específico junto con el LV FAM2 descrito en el presente documento permitió a los inventores expresar Ab AR3A de membrana y secretado en proporciones que fueron moduladas por el

estado de diferenciación de células B en líneas celulares y células humanas primarias. De hecho, utilizando líneas de células B que están sesgadas hacia fenotipos secretores (similares a PC) o no secretores (similares a células B maduras), los inventores destacaron la producción tanto de IgG1 BCR anclada a la membrana como de anticuerpos secretados *in vitro* usando el vector FAM2. La expresión de la forma anclada a la membrana de Ig se correlacionó inversamente con su secreción en los sobrenadantes.

[0254] Se diseñaron vectores FAM1 y FAM2 para determinar si la secuencia intrónica entre M1 y M2 era esencial para el corte y empalme correcto del ARNm de Ig. Los inventores descubrieron que las células B modificadas con LV FAM1 se comportaban con un perfil intermedio entre FSS y FAM2 y las células transducidas con FAM0, ya que permitían predominantemente la expresión de la forma Ab secretada, pero no de la forma unida a membrana. Por lo tanto, los inventores demostraron que, en el contexto de un LV, la secuencia intrónica corta que separa los exones M1 y M2 como en el LV FAM2 es crucial para el corte y empalme apropiado del ARNm de Ig.

[0255] Los estudios previos destinados a determinar las formas de Ig producidas durante la maduración de las células B utilizaron ensayos de diferenciación *in vivo* de células B a PC en ratones coinyectados con células T mejoraron la producción de Ig. Por lo tanto, los inventores coinyectaron células T auxiliares CD4<sup>+</sup> y células B humanas en ratones inmunodeficientes y descubrieron que las células B transducidas eran capaces de diferenciarse en PC después de la transferencia adoptiva en ratones NSG. Es importante destacar que detectaron un alto nivel de secreción de Ig después de la maduración de células B *in vivo* con una producción significativa de AR3A secretado en sueros de ratones injertados con células B transducidas con LV FAM2, lo que demostró que la modificación de las células B por el LV FAM2 condicional no interfirió con la maduración de células B. AR3A representó aproximadamente el 0,02 % del total de Ab IgG en sueros de ratón. En comparación, el anticuerpo IgG1 anti-toxina tetánica representa aproximadamente el 0,08% del total de IgG en adultos vacunados.

[0256] La presentación específica de Ag del VHC a células B modificadas debería permitir la amplificación de células B que expresan BCR y la maduración concomitante en PC secretora de AR3A. Un objetivo importante de la presente estrategia de expresión de Ig condicional era mantener un nivel basal de secreción de AR3A junto con, en ausencia de estimulación, una forma de BCR anclada a la membrana para evitar una producción continua alta y potencialmente perjudicial de Ab. Considerando que la expresión del Ab transgénico a partir del vector FAM2 es más compleja que la expresión de una forma secretada que carece de secuencias intrónicas (tales como, por ejemplo, a partir del LV FSS), los inventores demostraron una producción eficaz de la forma de Ab soluble en PC humanas diferenciadas *in vivo*. De hecho, la concentración de AR3A en sueros de ratón después de la transferencia adoptiva de células B estimuladas fue suficiente para neutralizar la infección por VHCc *in vitro*. Paralelamente, la IgG1 transgénica secretada representó aproximadamente el 0,02 % del total de hulgG en los sueros de ratón, en ausencia de activación específica por los antígenos del VHC. El objetivo de este vector es mantener el nivel basal de IgG1 transgénica sin activación inmunogénica. Después de la estimulación antigénica de VHC-E2 específica, la amplificación y diferenciación de la célula B madura transgénica que expresa la forma BCR debería proporcionar un conjunto de células secretoras capaces de producir Ab AR3A.

[0257] La inmunoprolifaxis vectorizada (VIP) es una alternativa atractiva a la inmunoterapia pasiva, ya que requiere una única inoculación *in vivo* de vectores virales para producir una expresión continua y sostenida de anticuerpos específicos. Los vectores basados en AAV son los vectores más utilizados para dicha estrategia en cancerología o enfermedades infecciosas. Sin embargo, la administración *in vivo* de vectores basados en AAV puede tener una baja eficacia debido a la alta prevalencia de anticuerpos anti-AAV preexistentes en la mayoría de las poblaciones humanas. Lo más importante es que se esperaría que la producción continua de anticuerpos de alto nivel fuera perjudicial para los pacientes. Por tanto, el LV condicional de la invención proporciona una estrategia alternativa atractiva al imitar la regulación natural de la producción de Ab después de la modificación *ex vivo* de células diana, a saber células B o células madre hematopoyéticas.

## Ejemplo 2

[0258] Este ejemplo confirma que los resultados descritos en el Ejemplo 1 usando vectores lentivirales pseudotipados con glicoproteína BaEV también se pueden obtener con vectores lentivirales pseudotipados con otras glicoproteínas que reconocen específicamente a células B o células madre hematopoyéticas CD34<sup>+</sup>.

### Material y procedimientos

#### *Construcciones de plásmidos*

[0259] Las construcciones de plásmido FSS, FAM0 y FAM2 se obtuvieron como se describe en el Ejemplo 1.

#### *Producción y titulación de lentivirales*

[0260] Los vectores lentivirales se obtuvieron como se describe en el Ejemplo 1, excepto que, en el caso de los vectores lentivirales pseudotipados con la glicoproteína del virus del sarampión, el plásmido de la envoltura codificaba las glicoproteínas modificadas HA24 y FΔ30 del virus del sarampión descritas en Frecha et al. (2008) Blood 112:4843-

4852.

*Aislamiento y transducción de células B*

5 [0261] Se aislaron células B y se transdujeron como se describe en el Ejemplo 1.

*Análisis de citometría de flujo*

10 [0262] El análisis de citometría de flujo se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 1.

Resultados

15 [0263] Los inventores evaluaron la expresión de IgG en células B humanas primarias. Utilizaron LV pseudotipados con envoltura de BaEV y LV pseudotipados con envoltura HF del virus del sarampión. Transdujeron células B CD19<sup>+</sup> primarias humanas purificadas con los LV FSS, FAM0 y FAM2 para investigar la producción de las dos formas activas de Ab AR3A *ex vivo*. Se transdujeron células B primarias a una MOI de 10-15 con cada vector para los vectores pseudotipados con envoltura BaEV y a una MOI de 1-10 con cada vector para vectores pseudotipados con envoltura HF del virus del sarampión, y se cultivaron adicionalmente durante 7 días en células del estroma MS5.

20 [0264] Los inventores encontraron un aumento significativo en el porcentaje de células que expresaban IgG1/k de superficie después de la transducción por los LV pseudotipados con HF FAM2 y FAM0 (incremento de 12,8 y 25,6 veces, respectivamente) en comparación con las células transducidas con los LV FSS (**Figuras 28 a 30**).

25 [0265] Los resultados observados con LV pseudotipados con HF son similares a los observados con LV pseudotipados con BaEV.

## REIVINDICACIONES

1. Ácido nucleico multicistrónico que comprende:

A) una secuencia que comprende sucesivamente:

A1) una secuencia que codifica el dominio variable de la cadena ligera de un anticuerpo de interés, fusionada en el marco con

A2) una secuencia que codifica la región constante de la cadena ligera de una inmunoglobulina Ig;

y

B) una secuencia que comprende sucesivamente:

B1) una secuencia que codifica el dominio variable de la cadena pesada de dicho anticuerpo de interés, fusionada en el marco con

B2) una secuencia que codifica las regiones constantes de la cadena pesada de una inmunoglobulina Ig' en forma secretora;

B3) una secuencia intrónica del gen de la cadena pesada de dicha inmunoglobulina Ig', consistiendo dicha secuencia intrónica entre 350 y 450 nucleótidos y comprendiendo un sitio de corte y empalme en 5' interno que permite el corte y empalme de dicha secuencia intrónica B3) y una señal de poli(A) específica secretora (pAS) del exón terminal en 3' de dicho gen;

B4) una secuencia, en marco con la secuencia B1), que codifica los dominios transmembrana y citoplasmático M1 y M2 de la inmunoglobulina Ig' BCR, en la que dicha secuencia B4) comprende, entre las secuencias codificantes de los dominios M1 y M2, una secuencia intrónica que contiene un sitio de corte y empalme que permite el corte y empalme de dicha secuencia intrónica entre las secuencias codificantes de los dominios M1 y M2; y

B5) una señal de poli(A) específica anclada a membrana (pAM), después del codón de parada del dominio M2.

en el que el ácido nucleico multicistrónico permite la coexpresión de las secuencias A y B en proteínas separadas y en el que dichas secuencias A y B están unidas mediante una secuencia de enlace que permite la coexpresión de las secuencias A y B en un único ARNm, siendo dicha secuencia de enlace una secuencia del sitio interno de entrada del ribosoma (IRES) viral o una secuencia que codifica polipéptidos 2A, y

en el que dicho ácido nucleico multicistrónico comprende antes de dicha secuencia A un promotor específico de células B unido operativamente a dicha secuencia A.

2. Ácido nucleico multicistrónico que codifica una quimera de dominio de unión a antígeno/proteína efectora, estando el dominio de unión a antígeno y/o la proteína efectora, respectivamente, formados por dos subunidades, comprendiendo dicho ácido nucleico:

A) una secuencia que comprende sucesivamente:

A1) una secuencia que codifica una primera subunidad AbD1 de un dominio de unión a antígeno AbD, fusionada en el marco con

A2) una primera subunidad EfP1 de una proteína efectora EfP, u opcionalmente una secuencia que codifica una proteína efectora EfP;

y

B) una secuencia que comprende sucesivamente:

B1) una secuencia que codifica una segunda subunidad AbD2 del dominio de unión a antígeno AbD, formando AbD2 en combinación con AbD1 un dominio de unión a antígeno que interactúa específicamente con un antígeno de interés, estando dicha secuencia B1 fusionada en el marco con

B2) una secuencia que codifica una segunda subunidad EfP2 de la proteína efectora EfP o una secuencia que codifica la proteína efectora EfP;

B3) una secuencia intrónica del gen de la cadena pesada de una inmunoglobulina Ig', consistiendo dicha secuencia intrónica entre 350 y 450 nucleótidos y comprendiendo un sitio de corte y empalme en 5' interno que permite el corte y empalme de dicha secuencia intrónica B3) y una señal de poli(A) específica secretora (pAS) del exón terminal en 3' de dicho gen;

B4) una secuencia, en marco con la secuencia B1), que codifica los dominios transmembrana y citoplasmático M1 y M2 de la inmunoglobulina Ig' BCR, en la que dicha secuencia B4) comprende, entre las secuencias codificantes de los dominios M1 y M2, una secuencia intrónica que contiene un sitio de corte y empalme que permite el corte y empalme de dicha secuencia intrónica entre las secuencias codificantes M1 y M2; y

B5) una señal de poli(A) específica anclada a membrana (pAM), después del codón de parada del dominio M2.

en el que el ácido nucleico multicistrónico permite la coexpresión de las secuencias A y B en proteínas separadas y en el que dichas secuencias A y B están unidas mediante una secuencia de enlace que permite la coexpresión de las secuencias A y B en un único ARNm, siendo dicha secuencia de enlace una secuencia del sitio interno de entrada del ribosoma (IRES) viral o una secuencia que codifica polipéptidos 2A, y

en el que dicho ácido nucleico multicistrónico comprende antes de dicha secuencia A un promotor específico de células B unido operativamente a dicha secuencia A.

3. Ácido nucleico que codifica una quimera de dominio de unión a antígeno/proteína efectora, comprendiendo dicho ácido nucleico:

A) una secuencia que codifica un dominio de unión a antígeno AbD que interactúa específicamente con un antígeno de interés; y

B) una secuencia que comprende sucesivamente:

B2) una secuencia que codifica una proteína efectora EfP;

B3) una secuencia intrónica del gen de la cadena pesada de una inmunoglobulina Ig', consistiendo dicha secuencia intrónica entre 350 y 450 nucleótidos y comprendiendo un sitio de corte y empalme en 5' interno que permite el corte y empalme de dicha secuencia intrónica B3) y una señal de poli(A) específica secretora (pAS) del exón terminal en 3' de dicho gen;

B4) una secuencia, en marco con la secuencia B2), que codifica los dominios transmembrana y citoplasmático M1 y M2 de la inmunoglobulina Ig' BCR, en la que dicha secuencia B4) comprende, entre las secuencias codificantes de los dominios M1 y M2, una secuencia intrónica que contiene un sitio de corte y empalme que permite el corte y empalme de dicha secuencia intrónica entre las secuencias codificantes M1 y M2; y

B5) una señal de poli(A) específica anclada a membrana (pAM), después del codón de parada del dominio M2.

en el que el ácido nucleico permite la expresión de las secuencias A y B en una única proteína,

en el que dicho ácido nucleico comprende antes de dicha secuencia A un promotor específico de células B unido operativamente a dicha secuencia A.

4. Ácido nucleico, según la reivindicación 3, en el que el dominio de unión a antígeno es un anticuerpo monocatenario o un anticuerpo de dominio único.

5. Vector retroviral de transferencia que comprende:

(i) un esqueleto retroviral de transferencia, y

(ii) el ácido nucleico multicistrónico, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, o el ácido nucleico, según la reivindicación 3 o 4, en orientación inversa.

6. Vector retroviral de transferencia, según la reivindicación 5, que comprende sucesivamente:

(i1) una LTR 5' modificada que comprende un potenciador de CMV sustituido por la región U3,

(i2) una secuencia psi y gag,

(i3) una secuencia flap de ADN/tracto central de polipurina (cPPT),

(i4) una secuencia de elemento sensible a Rev (RRE),

(i5) una secuencia del elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE), y

(i6) una LTR 3' autoinactivante que comprende una delección en la región U3 que hace que la LTR 5' del provirus integrado sea transcripcionalmente inactiva,

en el que el ácido nucleico multicistrónico o ácido nucleico (ii) está ubicado en orientación inversa entre las secuencias (i4) y (i5).

7. Procedimiento para producir una partícula de vector viral pseudotipada capaz de transferir específicamente, a células madre hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> o células B, un ácido nucleico que codifica un anticuerpo o quimera, siendo expresado dicho anticuerpo o quimera por dichas células bajo forma anclada a membrana y/o forma secretada, dependiendo del estado de maduración de dicha célula, comprendiendo dicho procedimiento:

a) transfectar una célula con

(i) el vector retroviral de transferencia, según la reivindicación 5 o 6,

(ii) un segundo ácido nucleico que comprende un ADNc que codifica proteínas centrales del mismo retrovirus que el vector retroviral de transferencia (i), y

(iii) un tercer ácido nucleico que comprende un ADNc que codifica una glicoproteína de la envoltura viral que reconoce células B o células madre hematopoyéticas CD34<sup>+</sup>,

para producir una célula productora;

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

c) permitir que las proteínas virales codificadas formen partículas de vectores virales pseudotipadas capaces de transferir específicamente, a células madre hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> o células B, un ácido nucleico que codifica un anticuerpo o quimera, siendo expresado dicho anticuerpo o quimera por dichas células bajo forma anclada a membrana y/o forma secretada, dependiendo del estado de maduración de dicha célula.

8. Kit que comprende:

(i) el vector retroviral de transferencia, según la reivindicación 5 o 6,

(ii) un segundo ácido nucleico que comprende un ADNc que codifica proteínas centrales del mismo retrovirus que el vector retroviral (i), y

(iii) un tercer ácido nucleico que comprende un ADNc que codifica una glicoproteína de la envoltura viral que reconoce células B o células madre hematopoyéticas CD34<sup>+</sup>.

9. Partícula de vector viral pseudotipada capaz de transferir específicamente, a células madre hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> o células B, un ácido nucleico que codifica un anticuerpo o quimera, siendo expresado dicho anticuerpo o quimera por dichas células en forma anclada a la membrana y/o en forma secretada, dependiendo del estado de maduración de dicha célula, en la que dicha partícula de vector viral pseudotipada comprende el ácido nucleico multicistrónico, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, o el ácido nucleico, según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 4, y está pseudotipada con una glicoproteína de envoltura viral que reconoce células B o células

madre hematopoyéticas CD34<sup>+</sup>.

10. Línea celular estable de empaquetamiento de virus que produce la partícula de vector viral pseudotipada según la reivindicación 9.

5 11. Medicamento que comprende:  
(i) una partícula de vector viral pseudotipada, según la reivindicación 9,  
(ii) un plásmido que comprende un ácido nucleico multicistrónico, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, o un  
10 ácido nucleico, según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 4,  
(iii) células madre hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> y/o células B transducidas con una partícula de vector viral pseudotipada  
según la reivindicación 9, o  
(iv) células madre hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> y/o células B transfectadas con un plásmido que comprende un ácido  
15 nucleico multicistrónico, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, o un ácido nucleico, según cualquiera de las  
reivindicaciones 3 a 4,  
como principio activo.

12. Composición de vacuna que comprende:

(a1) una partícula de vector viral pseudotipada, según la reivindicación 9,  
20 (a2) un plásmido que comprende un ácido nucleico multicistrónico, según la reivindicación 1,  
(a3) células madre hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> y/o células B transducidas con una partícula de vector viral pseudotipada,  
según la reivindicación 9, o  
(a4) células madre hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> y/o células B transfectadas con un plásmido que comprende un ácido  
25 nucleico multicistrónico, según la reivindicación 1,  
y (b) un portador farmacéuticamente aceptable.

25 13. Partícula de vector viral pseudotipada, según la reivindicación 9, un plásmido que comprende un ácido nucleico  
multicistrónico, según la reivindicación 1, células madre hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> y/o células B transducidas con una  
partícula de vector viral pseudotipada, según la reivindicación 9, o células madre hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> y/o células  
30 B transfectadas con un plásmido que comprende un ácido nucleico multicistrónico, según la reivindicación 1, para su  
uso como medicamento para inmunoprofilaxis vectorizada.

35 14. Partícula de vector viral pseudotipada, según la reivindicación 9, un plásmido que comprende un ácido nucleico  
multicistrónico, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, o el ácido nucleico, según cualquiera de las  
reivindicaciones 3 a 4, células madre hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> y/o células B transducidas con una partícula de vector  
viral pseudotipada, según la reivindicación 9, o células madre hematopoyéticas CD34<sup>+</sup> y/o células B transfectadas con  
un plásmido que comprende un ácido nucleico multicistrónico, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, o  
40 el ácido nucleico, según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 4, para su uso para tratar y/o prevenir una enfermedad  
infecciosa, una enfermedad inflamatoria o un cáncer.

40 15. Uso de la partícula de vector viral pseudotipada, según la reivindicación 9, o de un plásmido que comprende un  
ácido nucleico multicistrónico, según la reivindicación 1, para inducir la expresión fisiológicamente regulada del  
anticuerpo anclado a la membrana y/o secretado de interés por una célula B *ex vivo*.

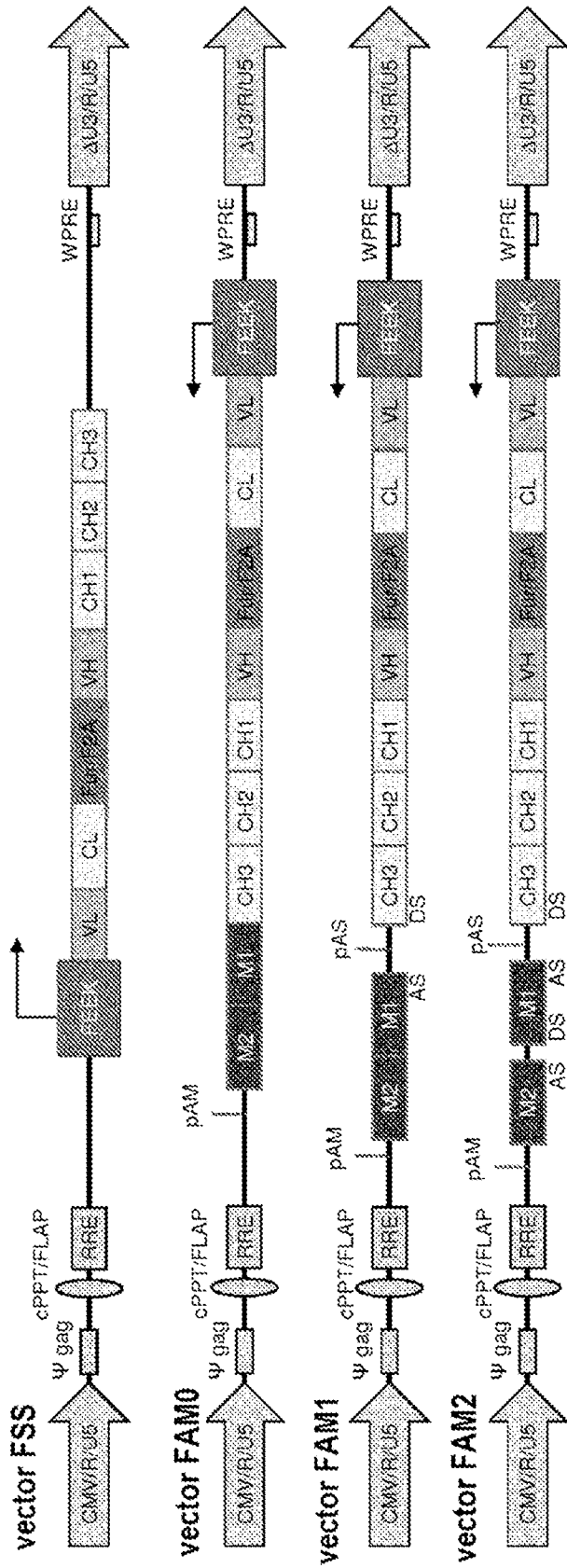


FIG 1

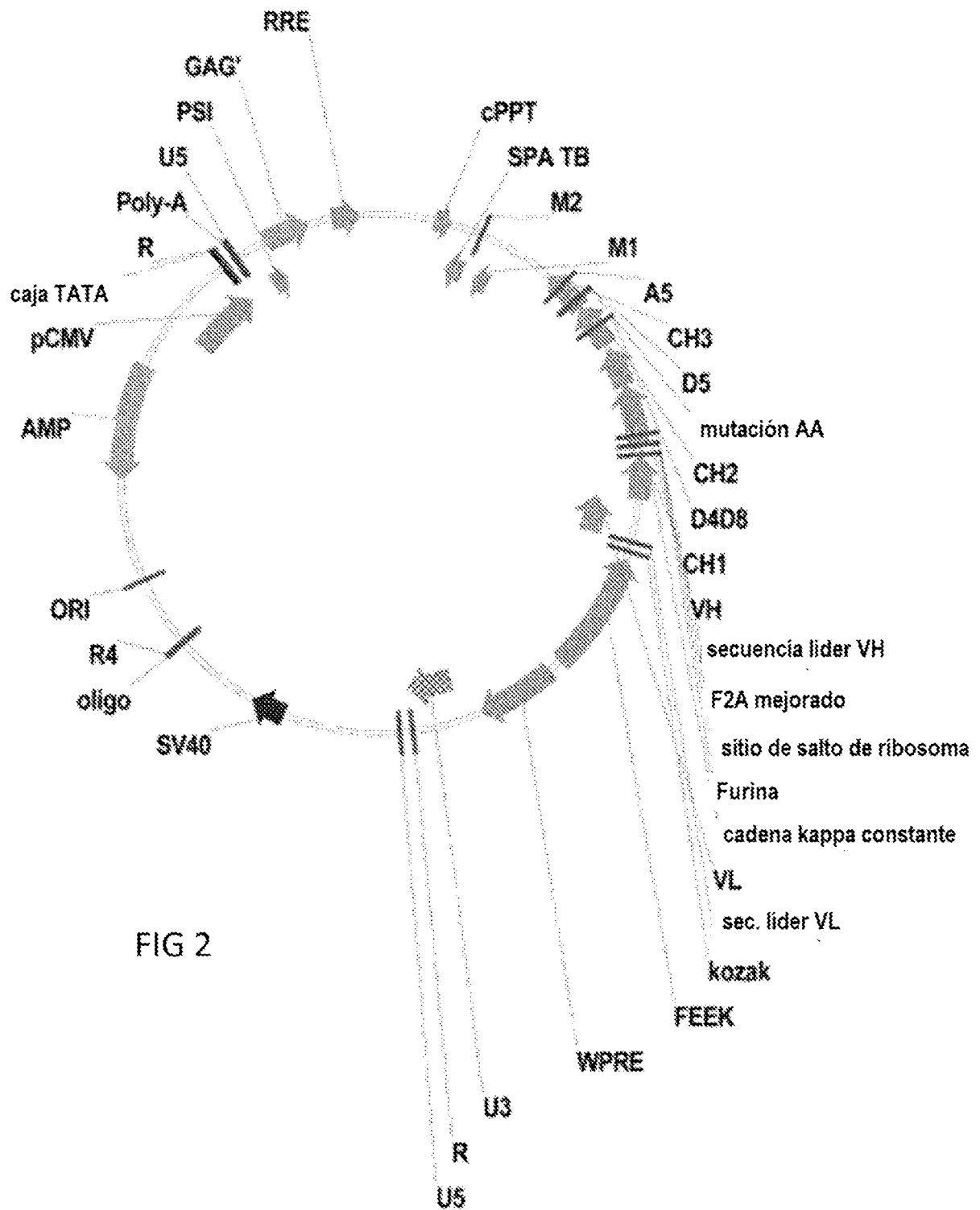


FIG 2

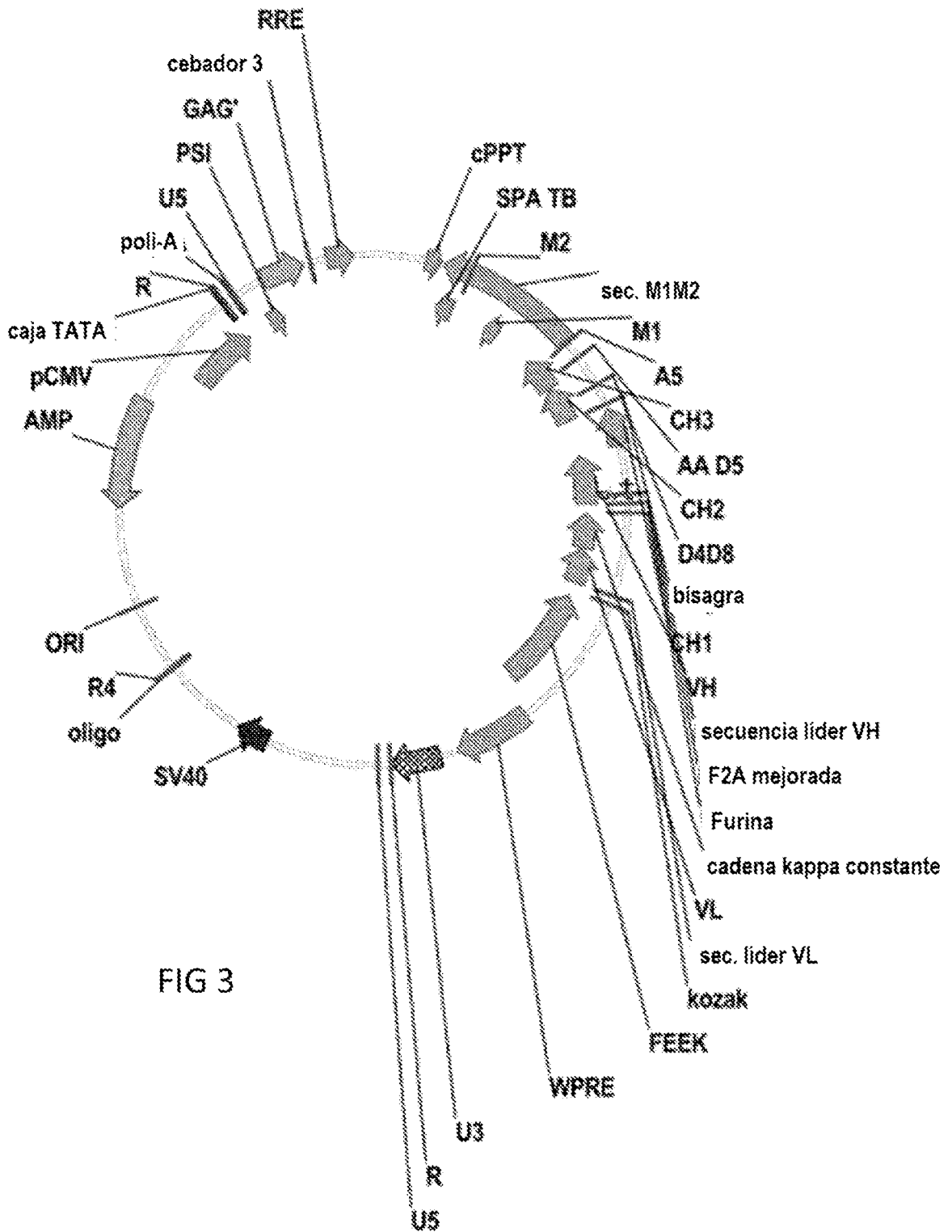


FIG 3

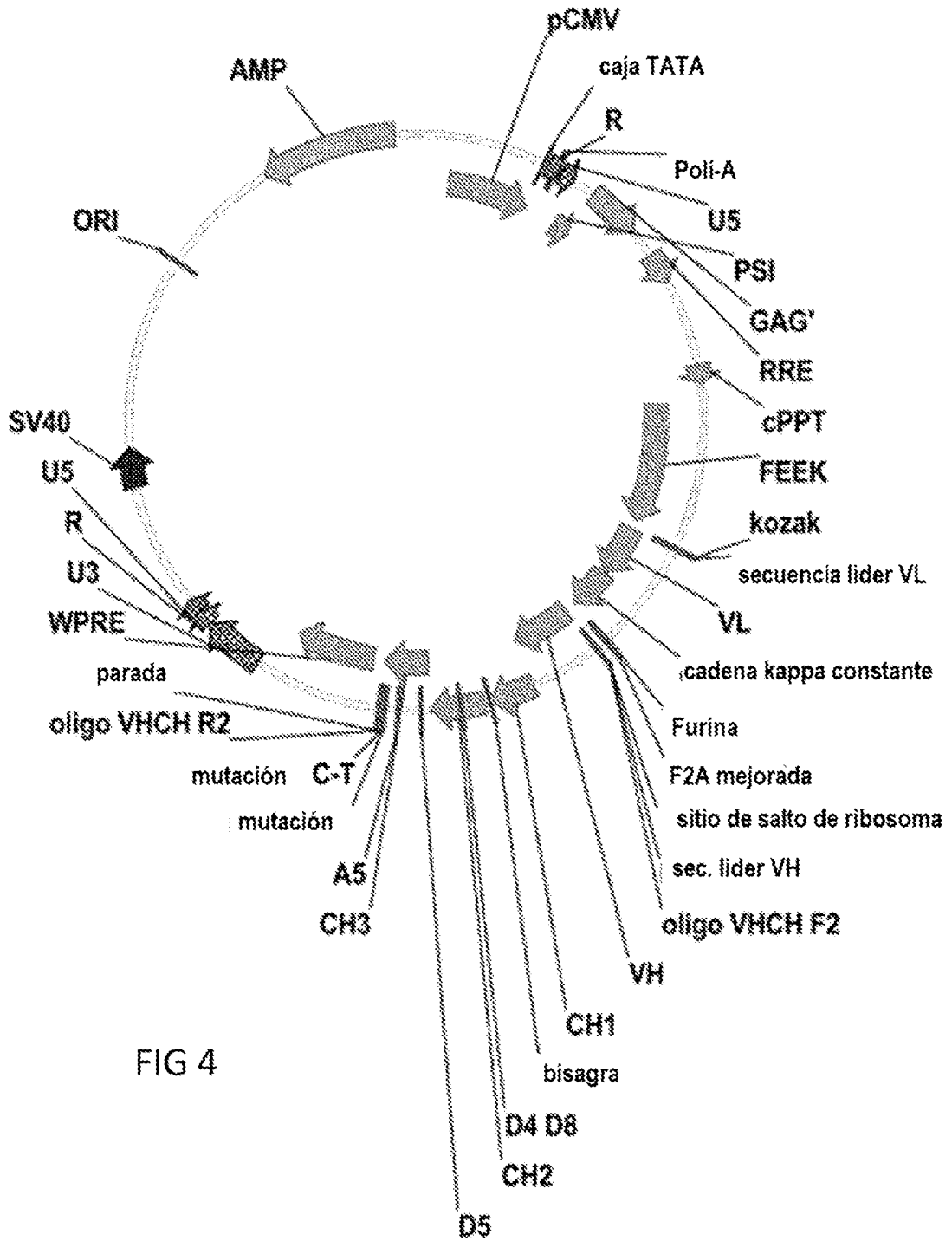
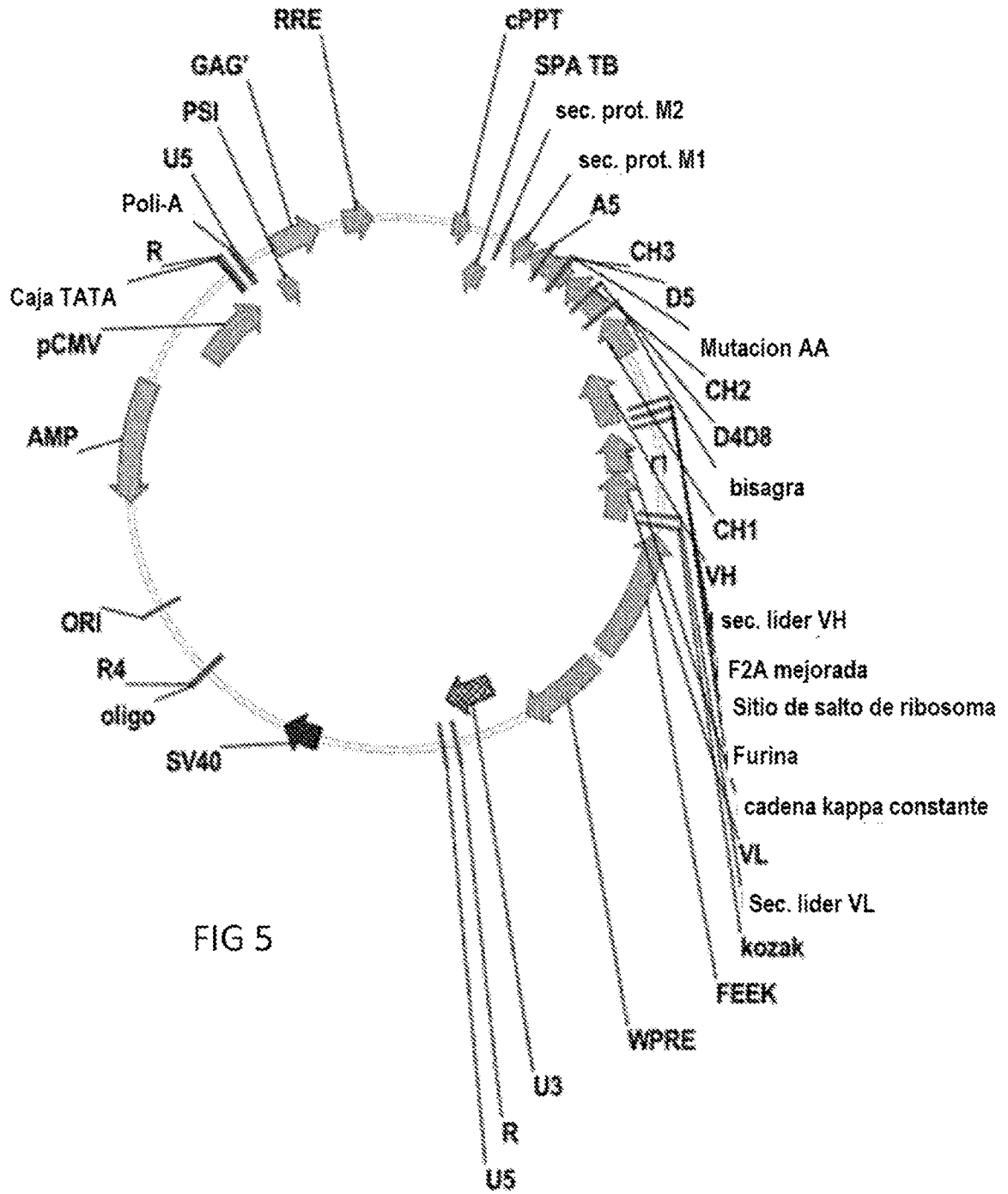


FIG 4



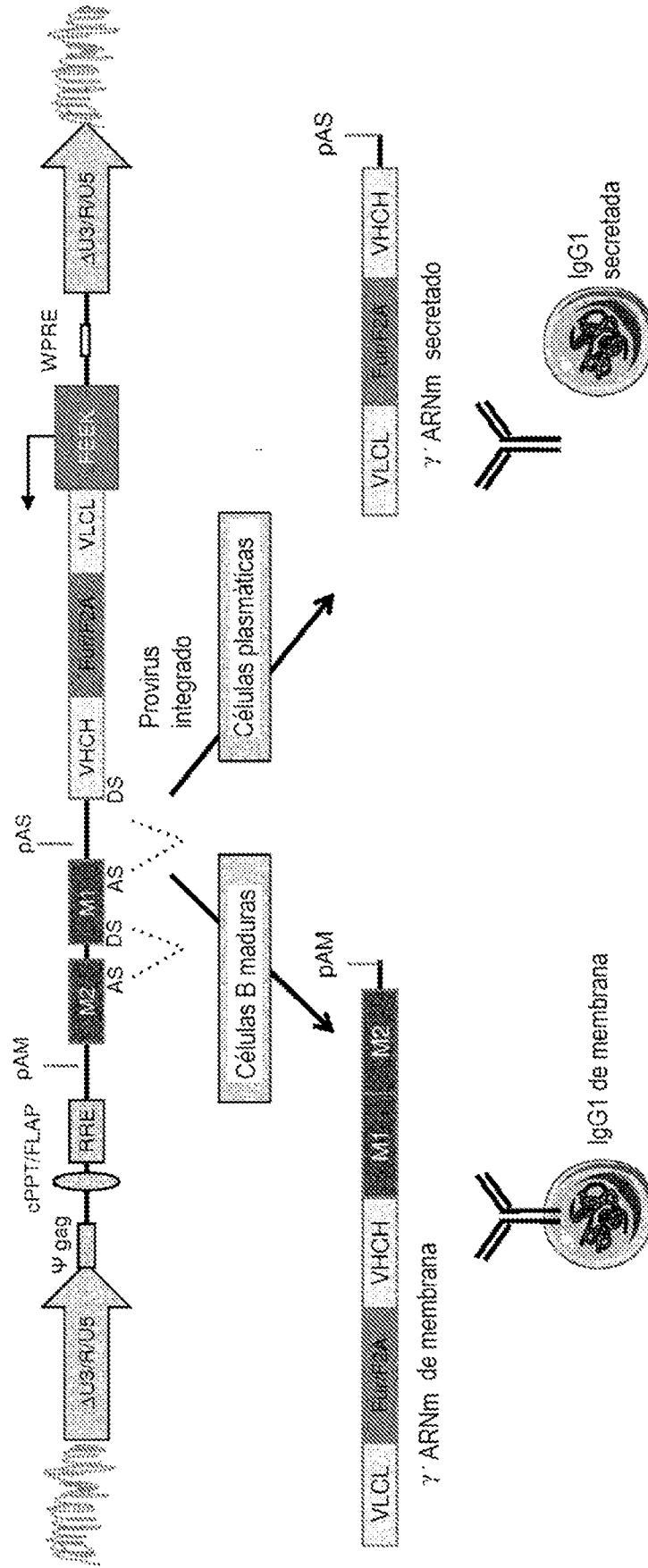


FIG 6

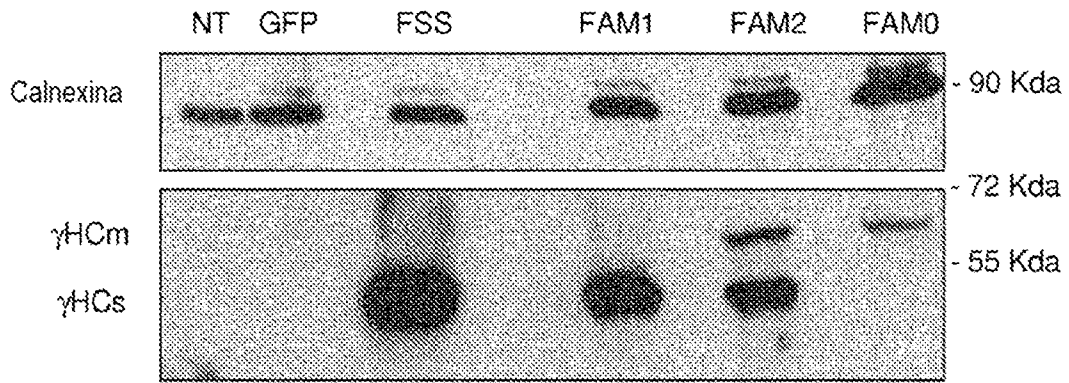


FIG 7

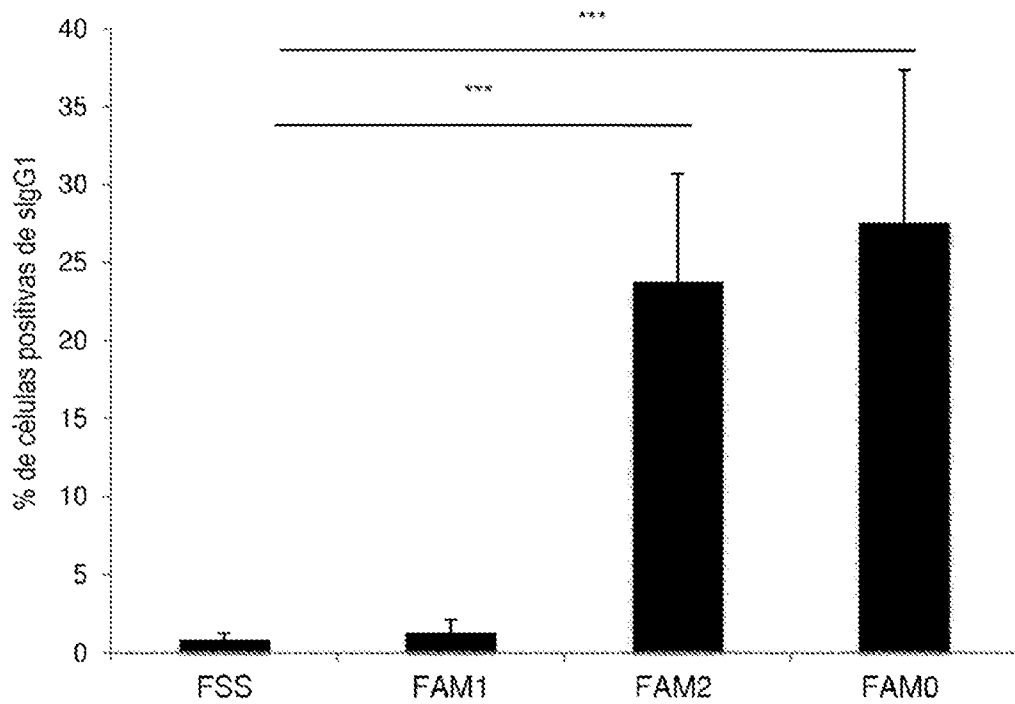


FIG 8

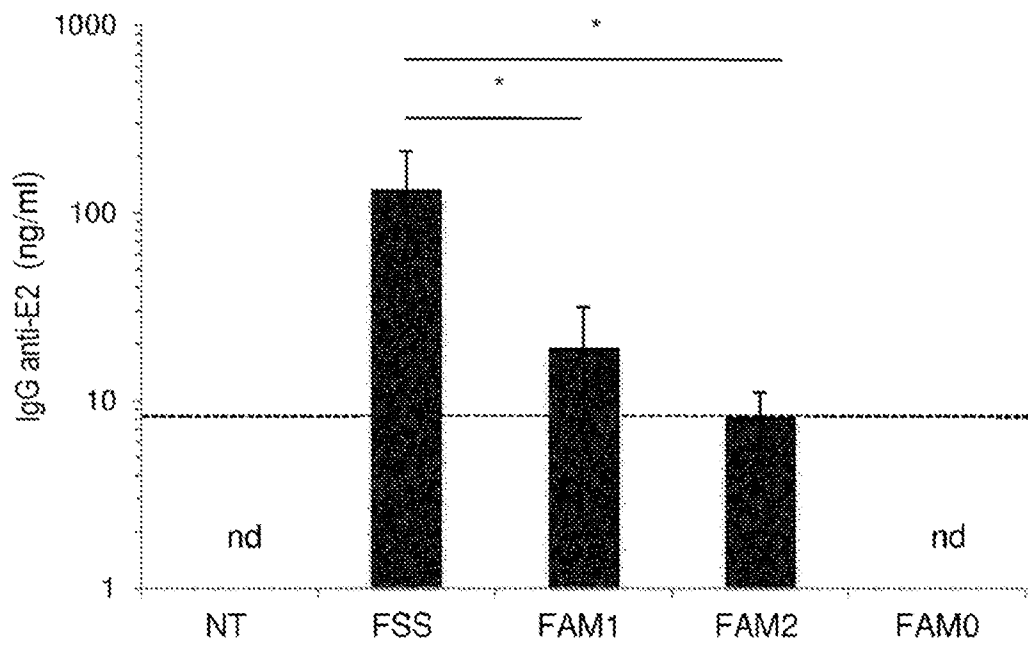


FIG 9

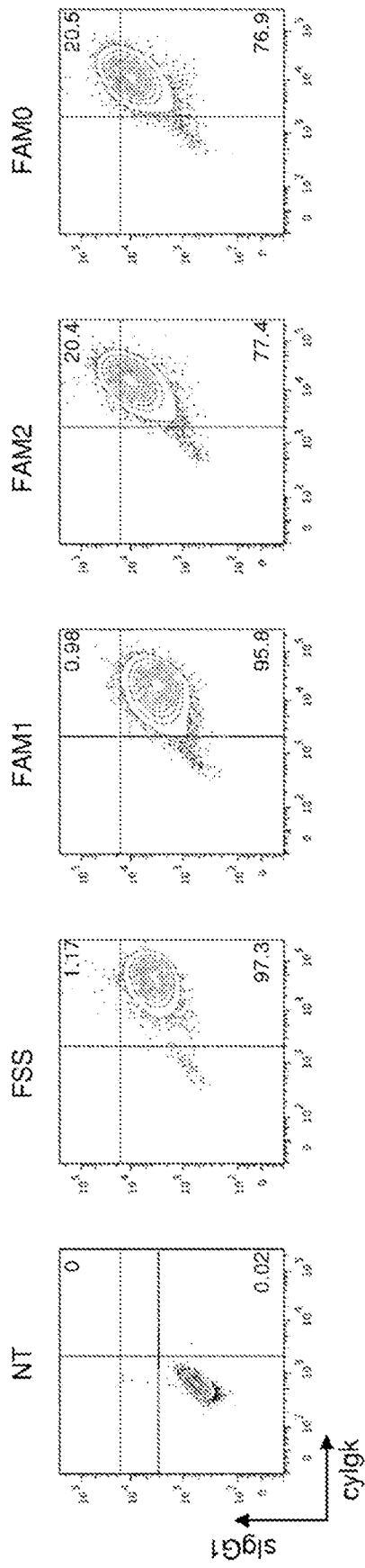


FIG 10

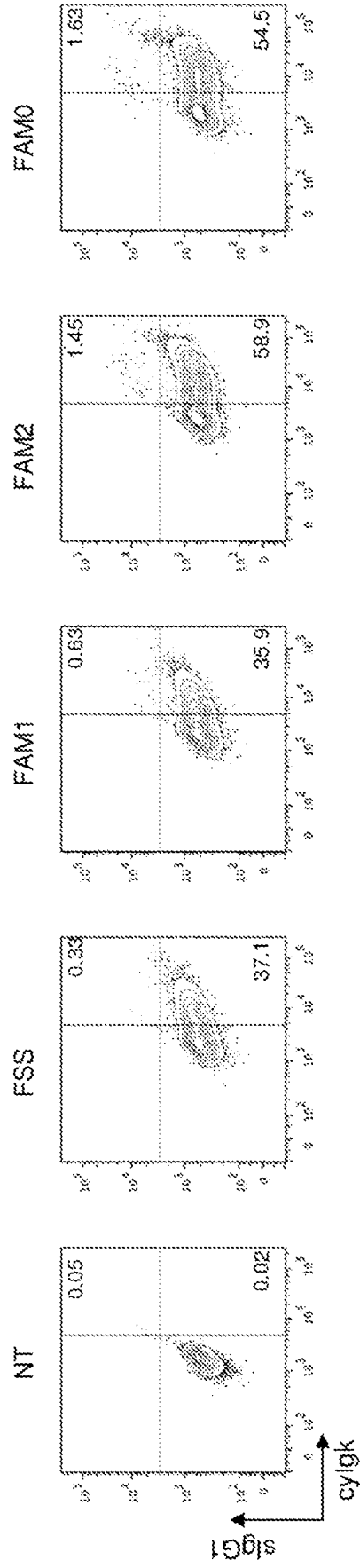


FIG 11

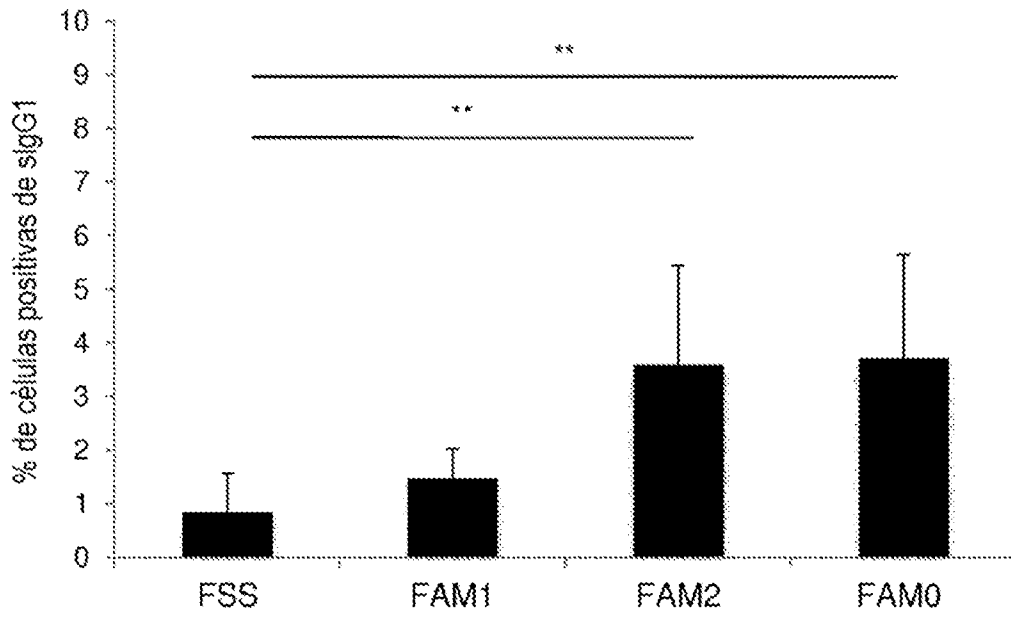


FIG 12

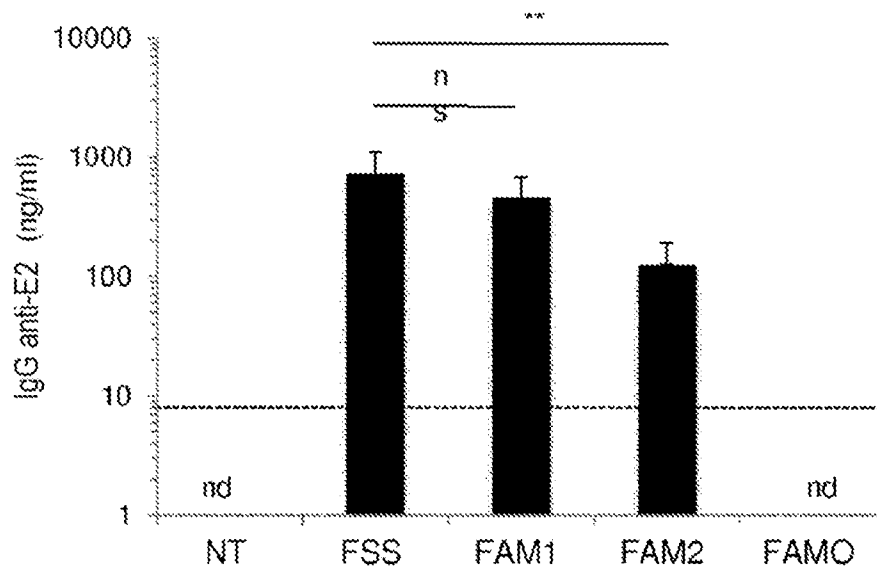


FIG 13

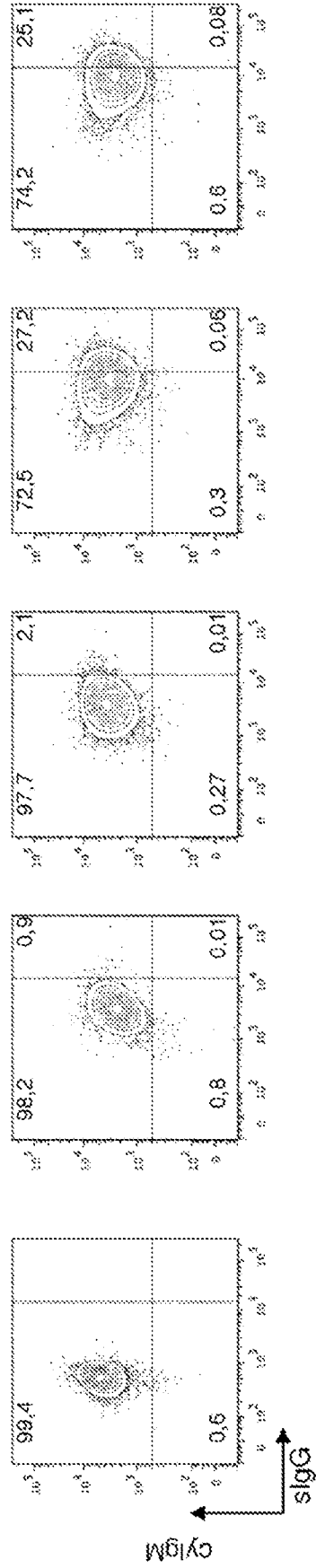


FIG 14

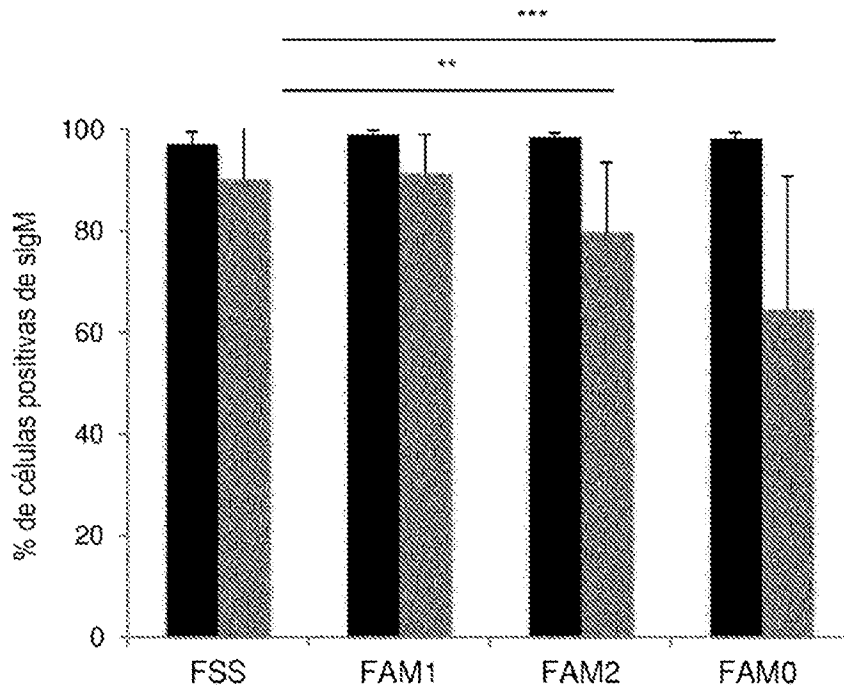


FIG 15

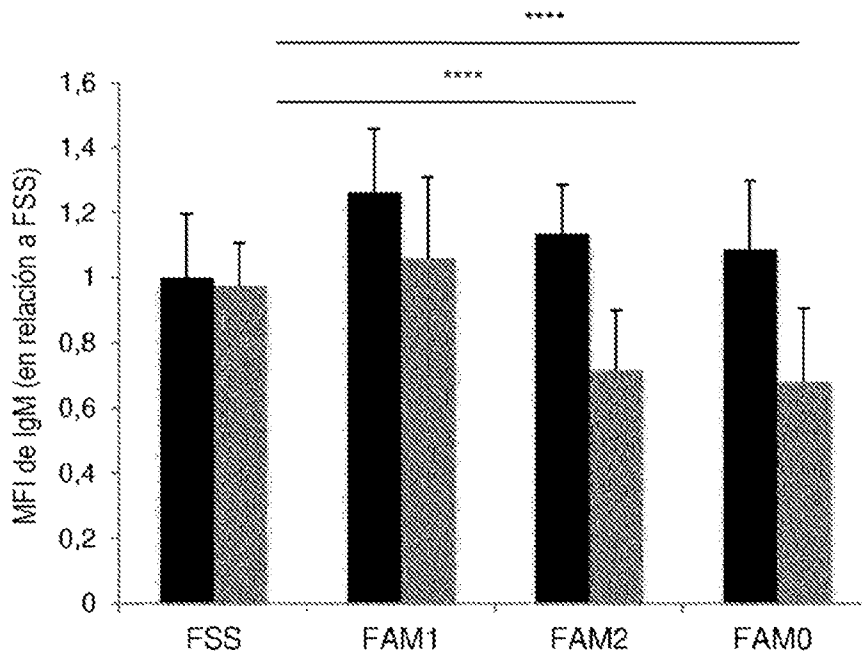


FIG 16

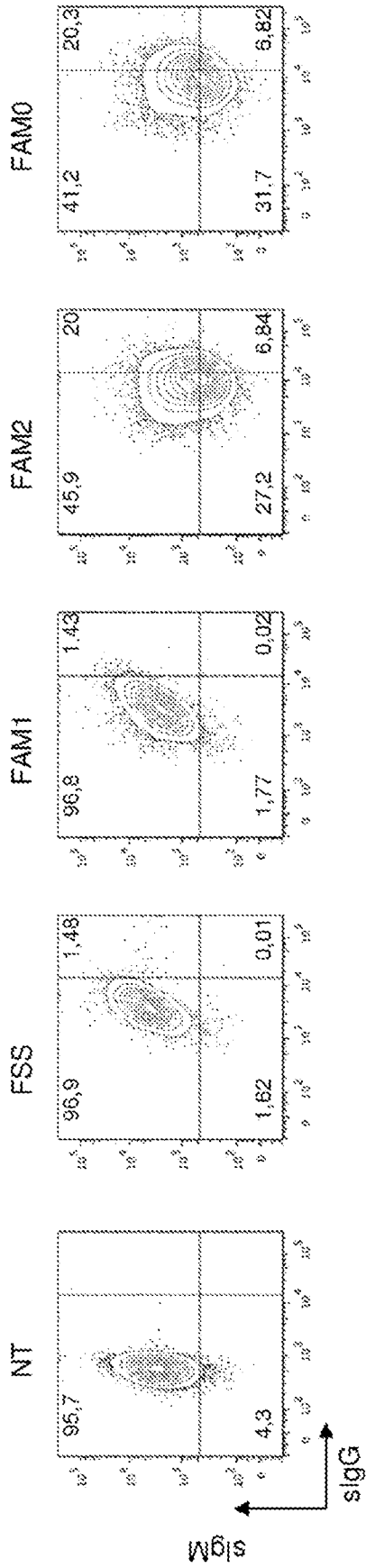


FIG 17

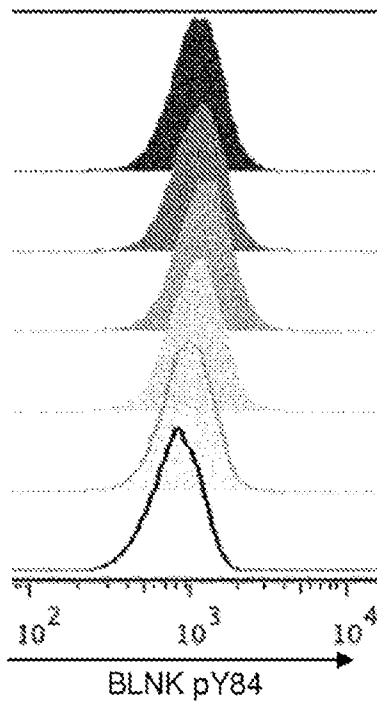


FIG 18

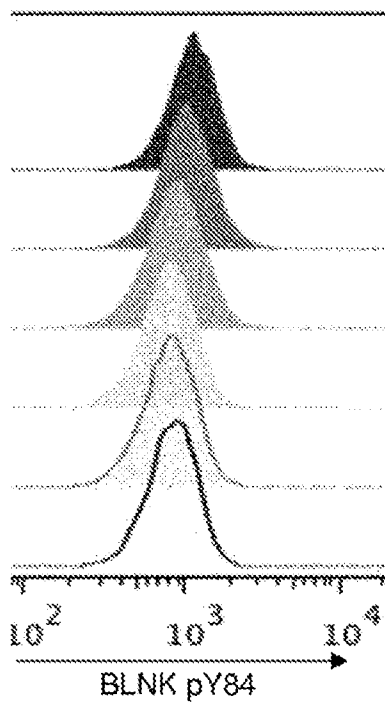


FIG 19

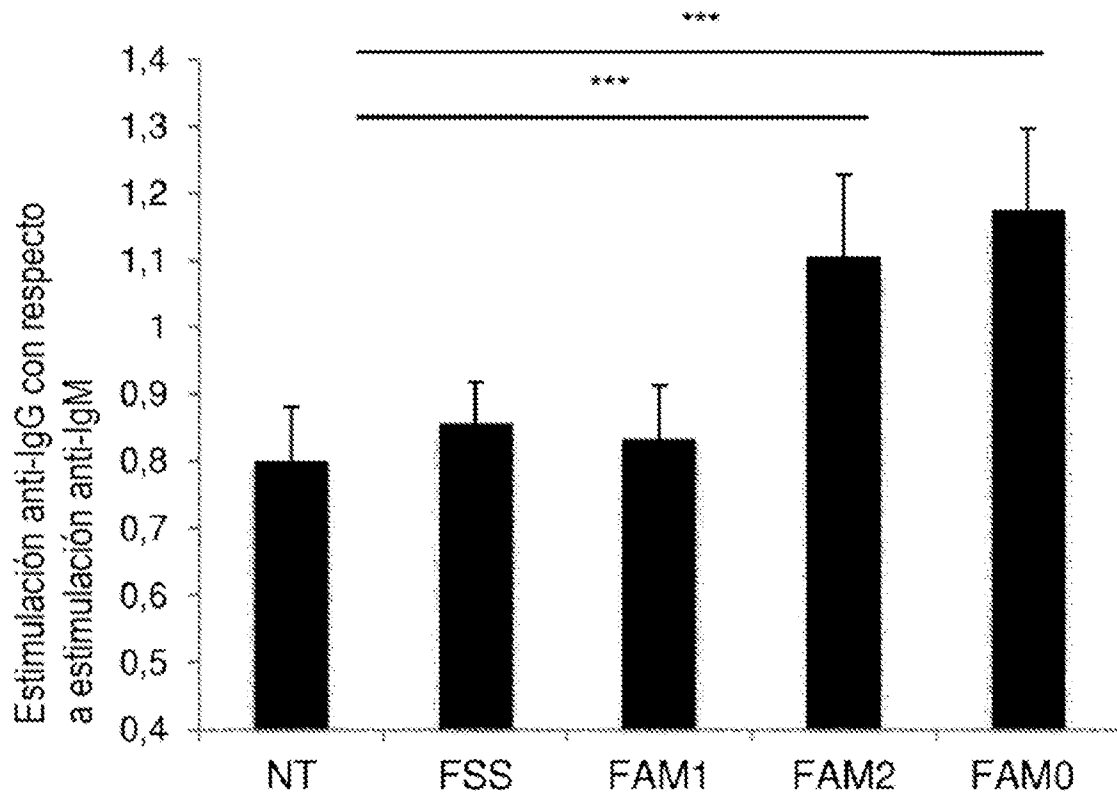


FIG 20

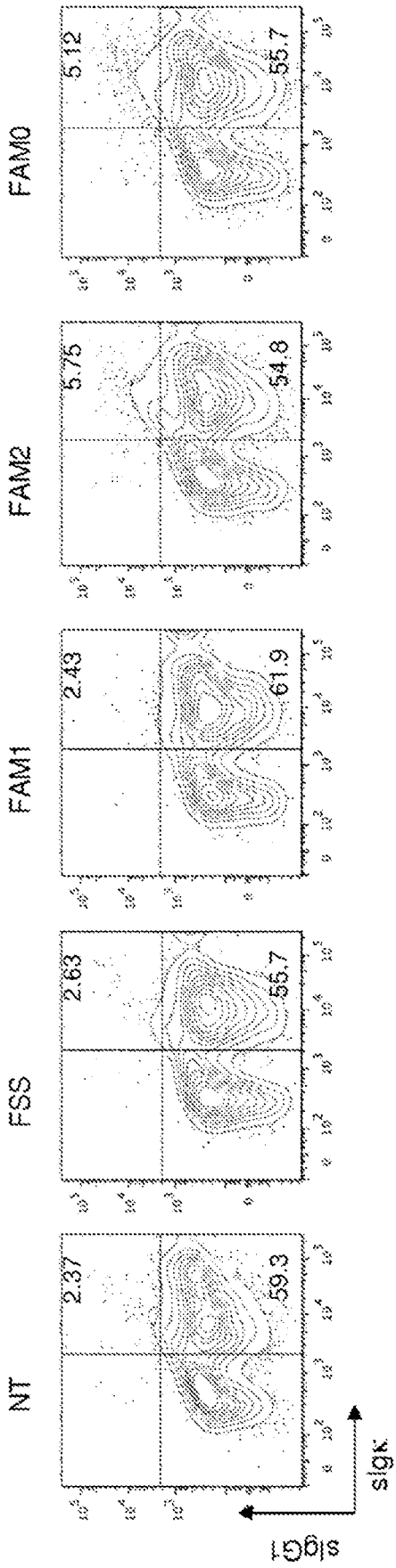


FIG 21

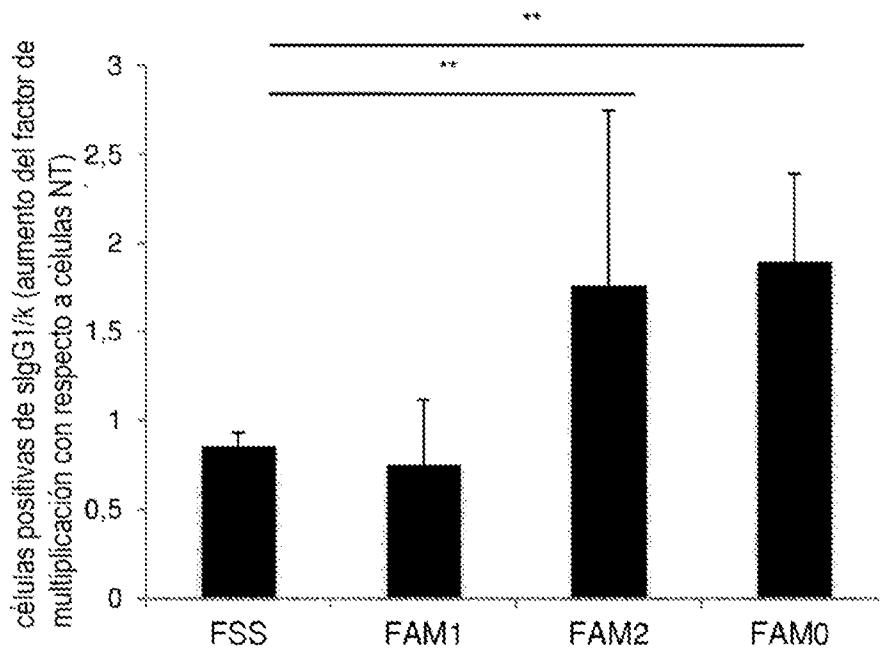


FIG 22

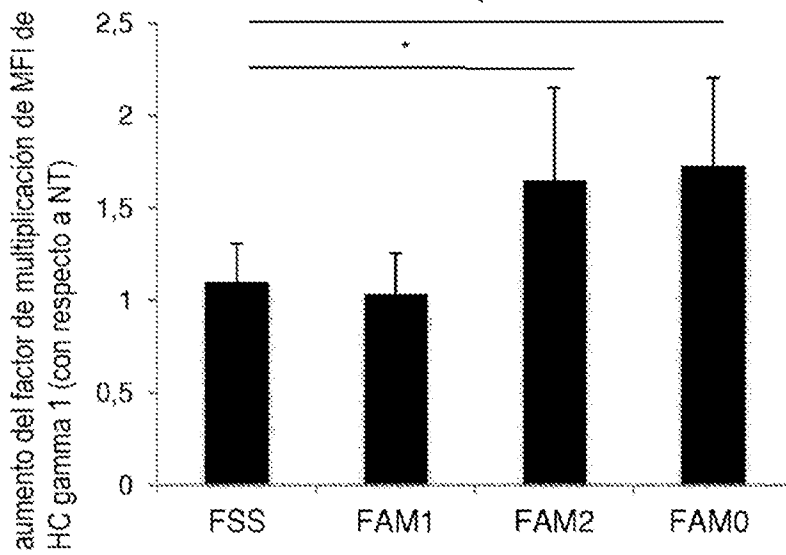


FIG 23

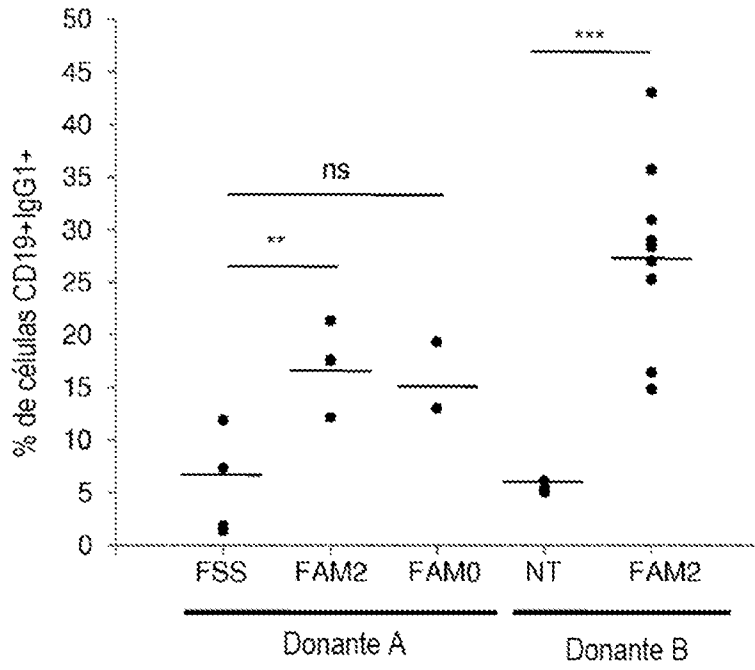


FIG 24

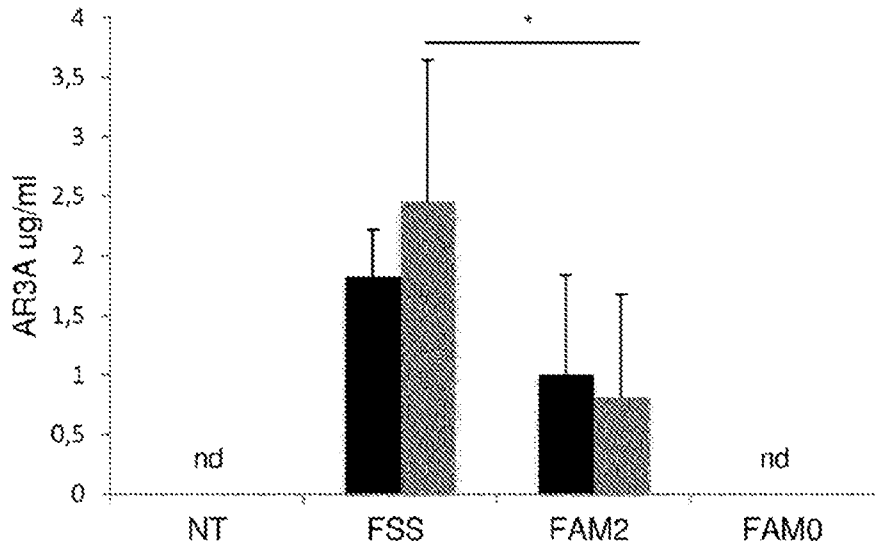


FIG 25

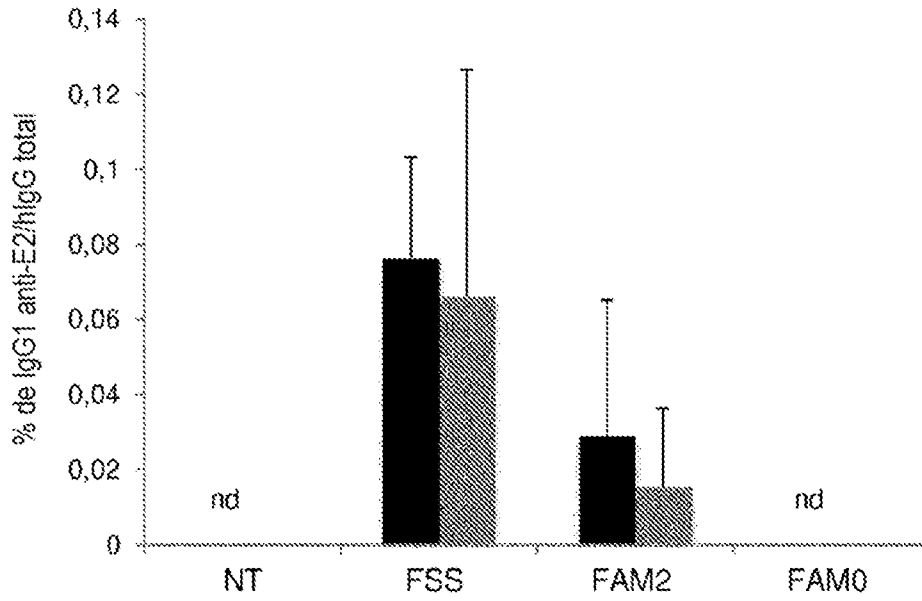


FIG 26

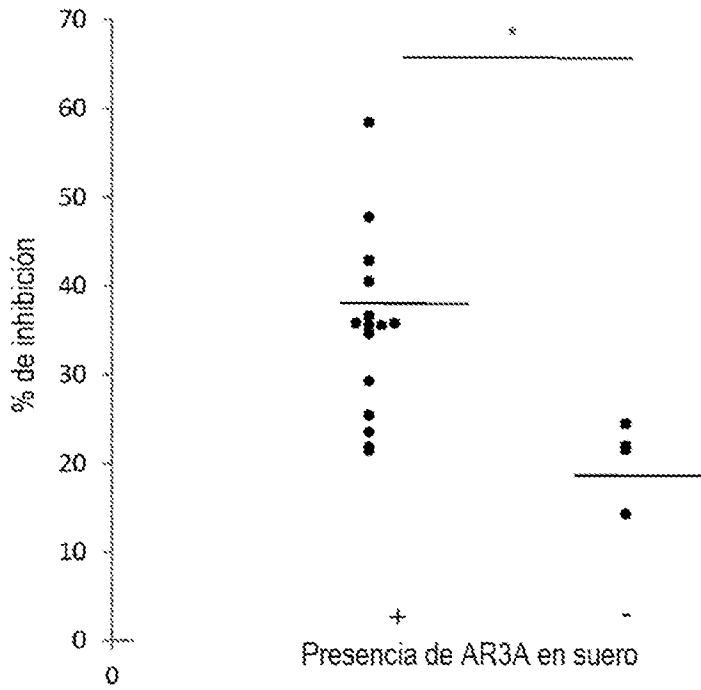


FIG 27

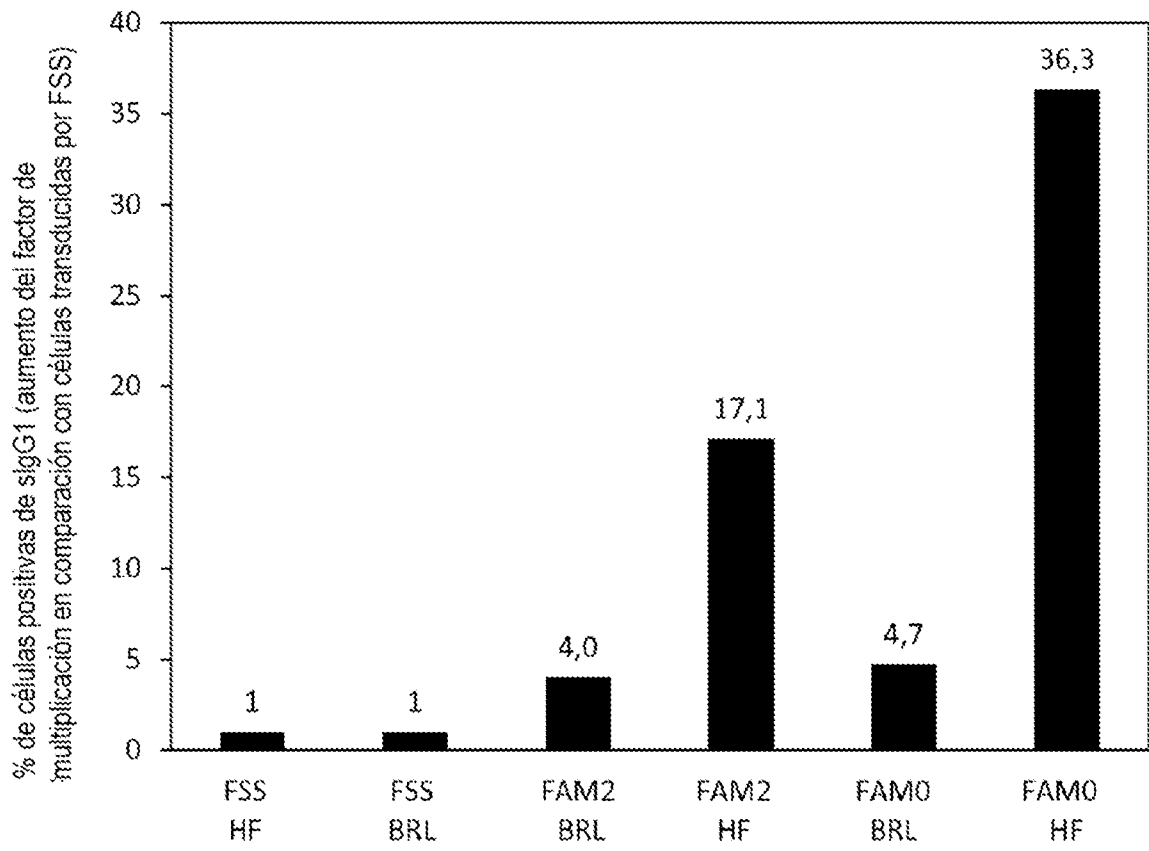


FIG 28

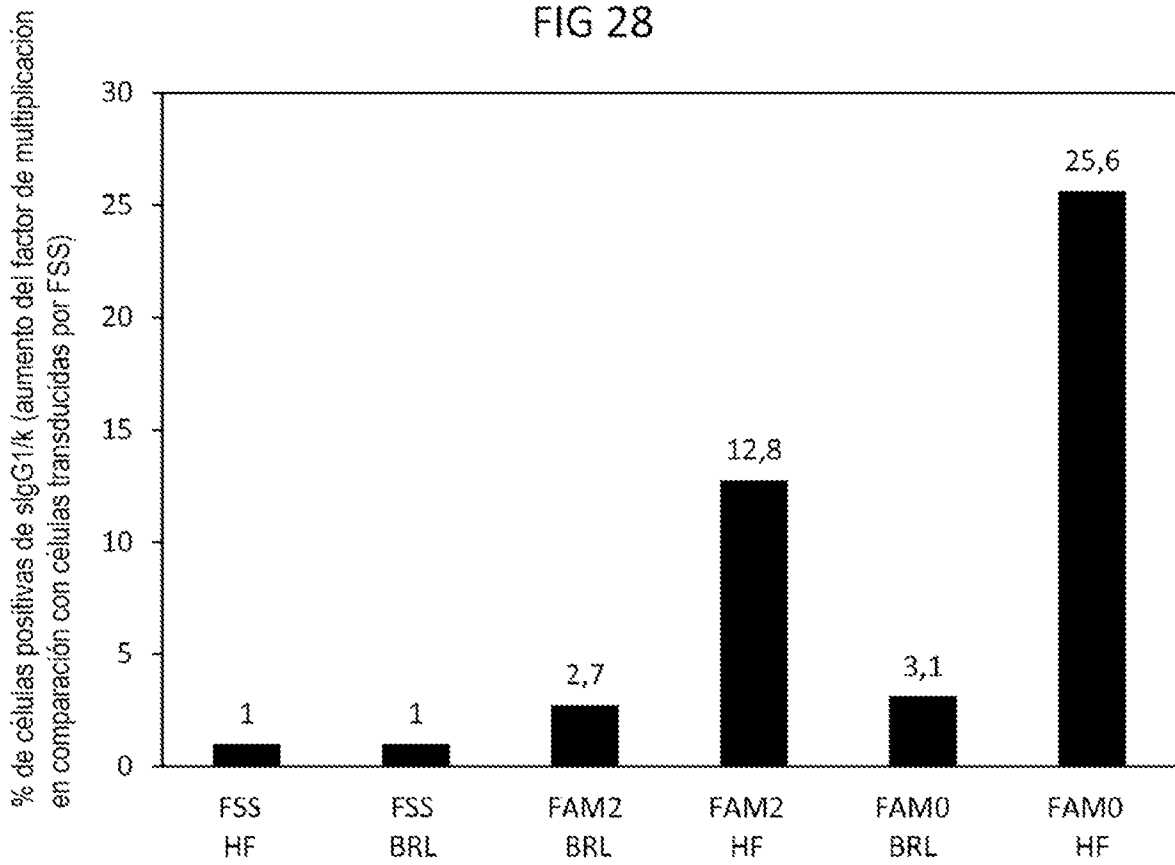


FIG 29

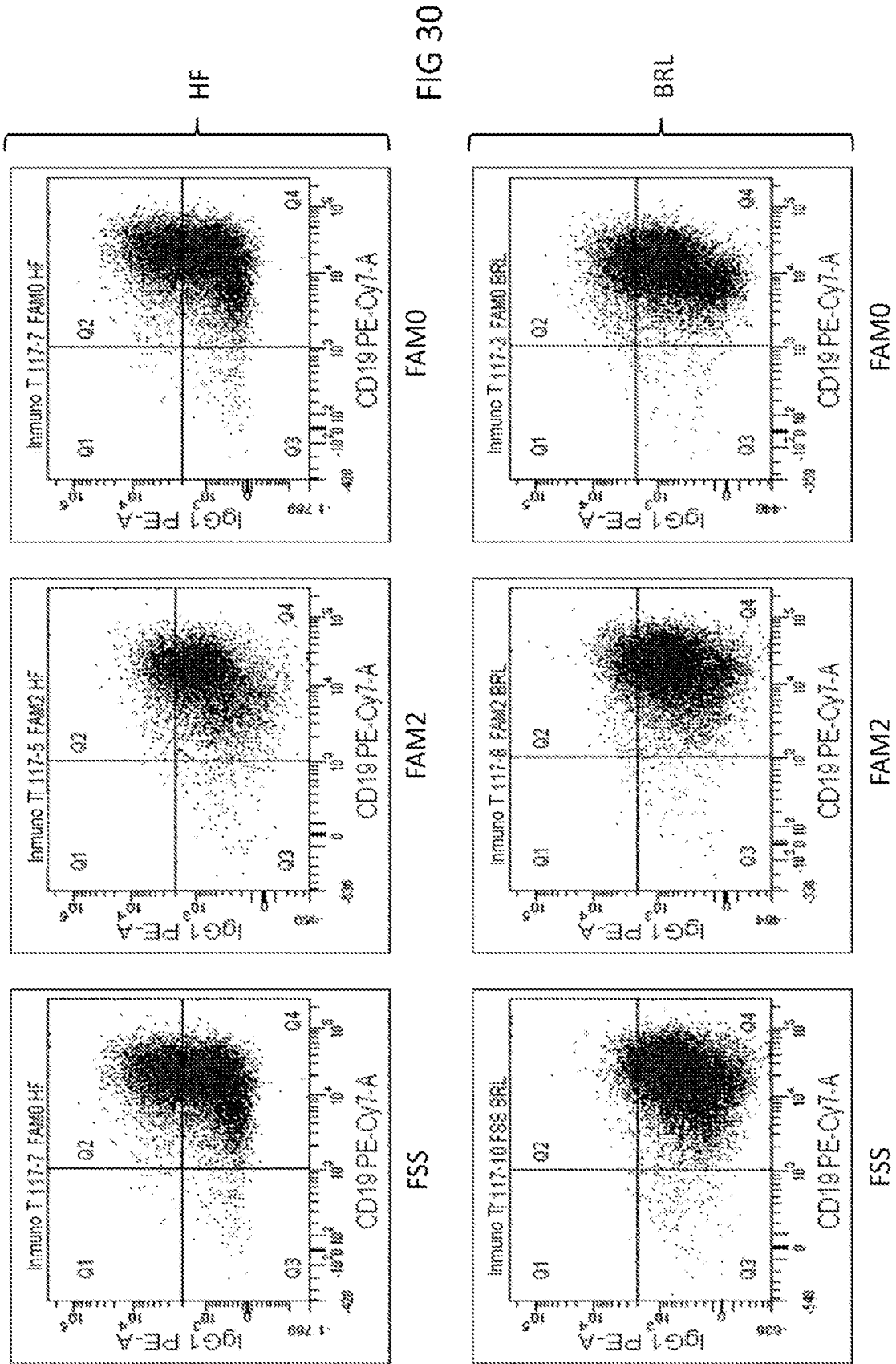


FIG 30