

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 447 115**

51 Int. Cl.:

C12N 15/86 (2006.01)

C12N 7/01 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C07K 14/35 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C12N 15/867 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.10.1999 E 09176531 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2013 EP 2169073**

54 Título: **Vectores para la preparación de composiciones inmunoterapéuticas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.03.2014

73 Titular/es:

INSTITUT PASTEUR (33.3%)
25-28, rue du Docteur Roux
75724 Paris Cedex 15, FR;
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (33.3%) y
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA
RECHERCHE MÉDICALE (33.3%)

72 Inventor/es:

CHARNEAU, PIERRE;
FIRAT, HÜSEYİN y
ZENNOU, VÉRONIQUE

74 Agente/Representante:

URÍZAR ANASAGASTI, Jesús María

ES 2 447 115 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vectores para la preparación de composiciones inmunoterapéuticas

- 5 La presente solicitud se refiere al uso de vectores retrovirales, y especialmente a vectores lentivirales para la preparación de composiciones que son capaces de inducir o contribuir a que tenga lugar o la mejora de una reacción inmunológica *in vitro*, y en una realización preferida *in vivo*, frente a epítomos que son codificados por secuencias de nucleótidos presentes en los vectores.
- 10 Los inventores han mostrado que los vectores preparados según la presente invención permiten obtener una respuesta inmune mediada por células, especialmente una reacción de linfocitos T citotóxicos (LTC) frente a epítomos.
- 15 La invención se refiere al uso de (a) un transgén que codifica uno o varios epítomos de carcinomas, leucemia o linfoma, situado bajo el control de señales reguladoras de transcripción y expresión, (b) una secuencia que contiene señales reguladoras de retrotranscripción, expresión y encapsidación de origen retroviral o similar a retroviral, y (c) regiones de iniciación central de acción en *cis* (cPPT) y de terminación de acción en *cis* (CTS) que pueden adoptar una estructura de tres cadenas tras transcripción inversa, siendo estas regiones de origen lentiviral e insertándose en una orientación funcional con respecto a las señales reguladoras de origen retroviral o similar a retroviral
- 20 mencionadas anteriormente, en la preparación de un vector.
- Además han obtenido datos que muestran que esta respuesta inmune mediada por células puede ser una respuesta específica, obtenida frente a uno o varios epítomos codificados por la secuencia de nucleótidos contenidos en los vectores.
- 25 También la solicitud da a conocer medios que podrían utilizarse para el tratamiento o profilaxis de enfermedades infecciosas, especialmente enfermedades asociadas con infección por virus y por ejemplo, con infección por retrovirus.
- 30 Los inventores además han obtenido resultados que muestran que la respuesta inmune mediada por células y especialmente la respuesta LTC asociada con el tratamiento mediante las composiciones de la invención puede ser específica para el antígeno del tumor o del virus o células infectadas por el virus, y también puede limitarse a moléculas específicas del CMH (complejo mayor de histocompatibilidad).
- 35 Particularmente la solicitud se refiere al uso de los vectores en composiciones inmunógenas, con el fin de obtener una respuesta inmune mediada por células limitada a las moléculas de clase I del complejo CMH y por ejemplo limitada a moléculas HLA-A2 o B7.
- 40 En consecuencia, la solicitud describe una composición inmunógena que comprende un vector recombinante que comprende un polinucleótido que engloba la región de iniciación central de acción en *cis* (cPPT) y la región de terminación de acción en *cis* (CTS). Durante la transcripción inversa, las secuencias cPPT y CTS inducen la formación de una estructura de ADN de tres cadenas denominada aquí en el presente documento como ADN tricatenario. El ADN tricatenario estimula la importación nuclear de genomas del ADN del vector, siendo estas regiones de origen lentiviral, comprendiendo dicho vector además una secuencia de nucleótidos definida (transgén o
- 45 secuencia de interés) y señales reguladoras de retrotranscripción, expresión y encapsidación de origen lentiviral, en el que la composición es capaz de inducir o estimular una respuesta de LTC (linfocitos T citotóxicos) o de CD4 frente a uno o varios epítomos codificados por la secuencia de transgén presente en el vector.
- 50 En una realización preferida, la respuesta inmune mediada por células y especialmente la respuesta de LTC o la respuesta de CD4 frente a uno o varios epítomos es una respuesta de LTC o de CD4 de memoria.
- Se enfatiza que la presencia, en el vector, de las regiones cPPT y CTS permiten que de ese modo se forme una estructura de ADN tricatenario influyendo y especialmente mejorando la importación nuclear del genoma del vector en células recombinadas con dicho vector.
- 55 Esta capacidad de la composición inmunógena para inducir, mejorar o en general para asociarse a los acontecimientos de la respuesta de LTC de memoria, permite proponer el uso de la composición inmunógena en los protocolos de terapia antitumoral o terapia antivírica o antipatógena, incluyendo si la respuesta inmune tiene que inducirse en un largo periodo de tiempo o ser al menos inducible cuando se busca una respuesta en un periodo de tiempo que puede ser inducción a largo plazo de la respuesta, tras la administración de la composición inmunógena.
- 60 En otras palabras, puede usarse la composición inmunógena para la preparación de composición terapéutica para el tratamiento de enfermedades tumorales o participando en la aparición de una respuesta inmune mediada por células, especialmente una respuesta de LTC o una respuesta de memoria.
- 65 Se enfatiza que la composición inmunógena, como consecuencia de la presencia de la estructura tricatenaria en la secuencia del vector, que resulta de la presencia de las regiones CTS y cPPT en el vector y en las partículas del

vector, permiten la estimulación de la importación nuclear del genoma del vector, en células diana. Los epítomos inducidos del vector pueden ser propios o no propios.

5 La presente solicitud describe también el uso de una secuencia nucleotídica que comprende las secuencias CTS y cPPT de origen lentiviral o sintético para aumentar la entrada de las secuencias de nucleótidos o de péptidos en el núcleo de las células diana o células receptoras.

10 Como ejemplo, se entiende que dicha secuencia de triple cadena comprende secuencias ajenas o secuencias propias con respecto a las células receptoras.

Por tanto, la solicitud describe una composición que podría utilizarse en protocolos terapéuticos que presentan analogías con los protocolos de vacunación, para el tratamiento de tumores y especialmente como tratamiento antineoplásico y anti enfermedades infecciosas.

15 Es interesante observar que de acuerdo con la presente invención este transgén o secuencia de interés puede ser una secuencia que codifique uno o varios epítomos de una o varias células tumorales de carcinomas, leucemia o linfoma, por ejemplo epítomos que se han identificado en antígenos diana potenciales para la inducción de una respuesta inmune mediada por células contra carcinomas, leucemia o linfoma.

20 Varios epítomos que forman un múltiple epítomo, pueden codificarse por el transgén de la invención. En una realización particular, pueden derivar de antígenos diana identificados en estos tumores, y pueden seleccionarse de tal modo que cuando su secuencia codificante se combine para formar el transgén, se obtenga una respuesta inmune mediada por células contra todos los epítomos o contra la mayoría de ellos. Puede ensayarse la respuesta inmune mediada por células *in vitro* o en una realización preferida *in vivo*. Los protocolos que permiten llevar a cabo tales ensayos se describen en los ejemplos.

30 Se han identificado antígenos diana en varios tipos de tumores. Dentro de la presente invención, el o los epítomos son de carcinomas, incluyendo carcinomas renales, carcinomas de vejiga, carcinomas de colon, carcinomas de pulmón, cáncer de mama, leucemia y linfoma.

35 Se añade también que los vectores preparados según la invención que se utilizan en las composiciones inmunógenas pueden expresar epítomos o pueden estar presentes en proteínas (incluyendo glucoproteínas u otros compuestos derivados de proteínas) identificadas como antígenos diana en las células tumorales anteriormente mencionadas.

Además, se observa que epítomos, polipéptidos o proteínas utilizadas para proporcionar epítomos, pueden modificarse, por ejemplo mediante mutación, delección o inserción y por ejemplo pueden modificarse para mejorar su estabilidad.

40 La solicitud desvela también una composición inmunógena que comprende partículas retrovirales recombinantes que comprenden:

45 1) una secuencia de nucleótidos recombinante que contiene una secuencia de nucleótidos definida (transgén), situada bajo el control de las señales reguladoras de la transcripción y expresión, señales reguladoras de la retrotranscripción, expresión y encapsidación y,

50 2) un polinucleótido que engloba la región de iniciación central de acción en cis (cPPT) y una región de terminación de acción en cis (CTS), siendo estas regiones de origen lentiviral e insertándose en una localización y orientación funcionales con señales reguladoras de retrotranscripción de origen retroviral o similar a retroviral o señales reguladoras de transposones,

en la que la composición inmunógena es capaz de inducir o de estimular una respuesta de LTC (linfocitos T citotóxicos) frente a uno o varios epítomos codificados por la secuencia de transgén presente en el vector.

55 El fragmento de ADN que engloba las secuencias activas-en cis CTS y cPPT es capaz de adoptar una estructura de ADN de tres cadenas, el "ADN tricatenario", tras la transcripción inversa y de estimular la entrada nuclear del ADN del vector.

60 Según una realización particular, la composición inmunógena que es capaz de inducir o de estimular una respuesta de LTC (linfocitos T citotóxicos) frente a uno o varios epítomos codificados por la secuencia de transgén presentes en el vector, comprenden partículas de vector retroviral recombinante que comprenden:

- a. un polipéptido gag que corresponde a nucleoproteínas de un lentivirus o a polipéptidos derivados funcionales (polipéptidos GAG),
- b. un polipéptido pol constituido por las proteínas RT, PRO, IN de un lentivirus o un polipéptido derivado funcional (polipéptido POL),
- c. un polipéptido de envoltura o polipéptidos derivados funcionales (polipéptidos ENV)

- 5 d. una secuencia de nucleótidos recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos definida (transgén o secuencia de interés), que codifica para uno o varios epítomos, situada bajo el control de señales reguladoras de transcripción y expresión, una secuencia que contiene señales reguladoras de retrotranscripción, expresión y encapsidación de origen retroviral o similar a retroviral y un polinucleótido que contiene una región de iniciación central de acción en cis (cPPT) y una región de terminación de acción en cis (CTS), siendo estas regiones de origen lentiviral e insertándose en una orientación funcional con las señales reguladoras mencionadas anteriormente de origen retroviral o similar a retroviral.
- 10 Las partículas de vector retroviral recombinantes que están presentes en la composición inmunógena que responden a una u otra de las definiciones anteriores son capaces en una realización preferida de inducir, mejorar o estar asociadas a la aparición de una respuesta inmune mediada por células de memoria y especialmente una respuesta de LTC de memoria.
- 15 Según lo anterior, pueden prepararse las definiciones descritas de la composición inmunógena que contiene los vectores o las partículas de vector según varias realizaciones posibles.
- En una realización preferida, se prepara la composición inmunógena de manera que las secuencias de origen retroviral se derivan de un genoma de lentivirus.
- 20 Según otra realización, estas secuencias son de origen similar a retroviral y se derivan de retrotransposón.
- En otra realización, o además de las características anteriormente definidas, el transgén o secuencia de interés que se contiene en el vector recombinante se contiene en un casete de expresión que incluye señales reguladoras de transcripción y expresión.
- 25 Alternativamente, las señales reguladoras de retrotranscripción, expresión y encapsidación del vector son de origen lentiviral y el polinucleótido que comprende las regiones CTS y cPPT es de origen lentiviral.
- 30 Según otra realización, las señales reguladoras de retrotranscripción, expresión y encapsidación y el polinucleótido que comprende las regiones CTS y cPPT en el vector, se derivan de un retrovirus de tipo VIH, en particular VIH-1 o VIH-2.
- 35 Pueden utilizarse otros virus y especialmente lentivirus para diseñar las señales reguladoras de retrotranscripción, expresión y encapsidación, y también para derivar el polinucleótido que comprende las regiones CTS y cPPT. Especialmente, por tanto pueden utilizarse los lentivirus CAEV, EIAV, VISNA, VIH, VIS o VIF.
- 40 Para la obtención de las partículas retrovirales recombinantes de la composición inmunógena, las secuencias que codifican para los polipéptidos o proteínas necesarias para la transcomplementación de los vectores son por ejemplo proteínas GAG, POL, y ENV derivadas de lentivirus, y especialmente de VIH, que incluye retrovirus VIH-1 y VIH-2.
- 45 Alternativamente, pueden derivarse las secuencias GAG y POL de un virus diferente que el de la secuencia ENV. Por ejemplo, pueden derivarse las secuencias GAG y POL del retrovirus VIH y la secuencia ENV puede derivarse de otro virus o retrovirus, y pueden ser secuencias ENV o bien anfotrópicas o bien ecotrópicas.
- En otra realización, la secuencia ENV se deriva del virus de la estomatitis vesicular (VEV).
- La solicitud se refiere también a constructos de vector que se han depositado con la CNCM (Collection Nationale de Culture de Microorganismes en el Instituto Pasteur en París, Francia) el 11 de octubre de 1999.
- 50 Un primer vector es pTRIP.TEL/AML-IRES-GFP, depositado bajo el número I-2326 el 11 de octubre de 1999 y un segundo vector se designa pTRIP-ILKE-IRES-GFP, y se ha depositado bajo el número I-2327 el 11 de octubre de 1999.
- 55 Un tercer vector, pTRIP.DES-IRES-GFP se ha depositado con la CNCM bajo el número I-2331 el 11 de octubre de 1999.
- Las secuencias que codifican para los antígenos que están presentes en los constructos anteriores pueden sustituirse por cualquier otro antígeno o epítomo de interés, incluyendo el gen DES completo citado anteriormente de *M. tuberculosis*.
- 60 Según otro aspecto, los vectores, partículas de vector y composiciones inmunógenas que comprenden los mismos, se diseñan de tal manera que las regiones CTS y cPPT se localizan centralmente dentro de la secuencia del vector.
- 65 Por «localizada centralmente», se quiere decir que las regiones CTS y cPPT están el centro de la secuencia del vector, o aproximadamente en el centro de esta secuencia. Especialmente, las regiones CTS y cPPT pueden estar en el tercio central del ADN del vector lineal retrotranscrito.

La localización central de la secuencia tricatenaria formada durante la retrotranscripción viral como consecuencia de la presencia de las secuencias CTS y cPPT permiten una mejora de los niveles de transducción de células en contacto con el vector o partículas del vector.

5 Alternativamente, según una variante del vector, puede insertarse la unidad de transcripción del vector, que incluye el transgén dentro de la región U3 de la región LTR. En consecuencia, tras la retrotranscripción, se duplica el transgén y por tanto aparece a cada lado de la secuencia tricatenaria, permitiendo por tanto que la secuencia tricatenaria se localice en la posición central en el vector, cualquiera que sea el tamaño del transgén.

10 La solicitud también describe células que se han puesto en contacto con la composición inmunógena descrita en el presente documento y especialmente se refiere a células recombinantes transducidas por el vector o partículas de vector de la composición inmunógena.

15 Estas células son, ventajosamente, células presentadoras de antígeno. A modo de ejemplo, pueden seleccionarse estas células de entre células de pulmón, células de cerebro, células epiteliales, astrocitos, microglía, oligodendrocitos, neuronas, células musculares, hepáticas, dendríticas, neuronales, cepas celulares de la médula ósea, macrófagos, fibroblastos, células hematopoyéticas.

20 Los tumores que pueden tratarse con las composiciones descritas en el presente documento son, por ejemplo, carcinomas, incluyendo (de pulmón, de vejiga, renal, de colon) y linfoproliferación.

Los tumores que pueden tratarse son también los tumores desvelados en el párrafo anterior que expresan antígenos específicos de tumor incluyendo proteína propia mutada y/o proteína propia sobreexpresada.

25 Son de interés cualquier vía de administración posible aceptable de la composición inmunógena desvelada en la solicitud incluyendo protocolos de administración que comprenden etapas *ex vivo*, por ejemplo transducción de células diana *ex vivo* seguida de administración de las células tratadas al paciente que va a tratarse.

30 Alternativamente, la composición inmunógena puede administrarse directamente al paciente a través de vías usuales de administración, incluyendo las vías de administración sistémica (IV), local, cutánea, intradérmica, por ejemplo intratumoral.

35 En una realización particular, la composición inmunógena puede administrarse directamente al paciente, de manera que inducirá, mejorará o participará *in vivo* en la aparición de una respuesta inmune mediada por células, especialmente una respuesta inmune mediada por LTC.

En otra realización, se utilizan las composiciones inmunógenas de modo que pueden permitir la aparición de una respuesta mediada por células de memoria a largo plazo.

40 Se enfatiza que la composición inmunógena tiene un particular interés debido a la propiedad de las secuencias CTS y cPPT que están presentes en el vector y partículas de vector, para inducir o para estimular la importación nuclear del genoma del vector en las células diana.

45 Una ventaja particular de las composiciones inmunógenas es que pueden utilizarse para provocar o estimular una respuesta inmune mediada por células frente a epítomos múltiples codificados por la secuencia de nucleótidos de interés o transgén presente en el vector o partículas de vector, y también pueden utilizarse para provocar o estimular una respuesta inmune mediada por células frente al producto de una secuencia completa de un gen, por ejemplo un gen de un agente patógeno o fragmentos de dicho gen capaz de codificar para al menos de 8 a 15 aminoácidos preferiblemente de 9 a 12 aminoácidos. La solicitud describe también una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia de aminoácidos que induce una respuesta celular y/o una secuencia de aminoácidos que contiene al menos 2 secuencias diferentes que corresponden a 2 epítomos de antígenos tumorales como se ha definido anteriormente.

55 **Leyenda de las figuras**

Figura 1: vector recombinante positivo de ADN tricatenario derivado de VIH-1 que codifica para múltiples epítomos de melanoma.

60 Figura 2: respuestas de LTC de ratones HHD tras la inmunización con el vector TRIP-mel-IRES-GFP.

Figura 3: expresión de GFP en células humanas 5 días después de su transducción por los vectores derivados de VIH-1 negativo o positivo de ADN tricatenario central.

65 Figura 4: respuestas de LTC *in vitro* utilizando células dendríticas humanas.

Figura 5: mapa de restricción del vector pHR.MEL-IRES-GFP

Secuencias de uno o múltiples epítomos de LTC específicos de melanoma

5 **Construcción de HR.MEL-IRES-GFP**

Para construir el plásmido HL.MEL-IRES-GFP, el fragmento NdeI/XhoI del TRIP.MEL-IRES-GFP depositado en la CNCM con el número I-2185 el 20 de abril de 1999 que contiene parte del promotor de CMV, los múltiples epítomos MEL y el IRES-GFP en lugar del fragmento NdeI/XhoI de HR GFP que contiene parte del promotor CMV y el GFP.

10

Figura 6: mapa de restricción del vector pTRIP.ILKE-IRES-GFP

Secuencias de uno o múltiples epítomos de LTC específicos de VIH, cuyo epítomo I9V.(ILKE); (RT 476-484)

15 **Construcción de TRIP.ILKE-IRES-GFP** (depositado en la CNCM, París, Francia el 11 de octubre de 1999 con el número I-2327).

Se construyó TRIP.ILKE-IRES-GFP mediante inserción del producto de PCR de ILKE en TRIP ΔE IRES-GFP, entre el promotor de CMV y el IRES. Se amplificó mediante PCR la región que rodeaba al epítomo LTC que empezaba por ILKE en la matriz pLAI con los cebadores:

20

5 ILKE : 5' TCAGATCTGCCACCATGGCACTAACAGAAGTAATACCAC 3'

3 RIILKE : 5' CGGAATTCTTATTGGCCTTGCCCCTGCTTC 3'.

Se insertó una secuencia de Kozak dentro del cebador en el sentido de 5' y se insertó un codón de parada dentro del cebador en el sentido de 3'. Tras la digestión con BglII/EcoRI se insertó el producto de PCR dentro de TRIP ΔE IRES-GFP dentro de los sitios BamHI/EcoRI. El vector expresa un mensajero bi-cistrónico que codifica para GFP y una región del gen de RT (transcriptasa inversa) de VIH, que corresponde a un grupo de epítomos, que comprenden especialmente el epítomo I9V (RT 476-484) restringido a HLA.A2.1 (Walker B.D., 1989 PNAS 86 pág. 9514-9518).

25

30 Figura 7: mapa de restricción del vector pTRIP.TEL/AML-IRES-GFP.

Secuencia de TEL/AML de translocación

Se construyó TRIP.TEL/AML-IRES-GFP mediante inserción del producto de PCR de TEL/AML dentro de TRIP ΔE IRES-GFP, entre el promotor de CMV y el IRES. Se amplificó mediante PCR la región que rodeaba la translocación entre TEL y AML con los cebadores:

35

5 Bgl TA : 5' GAAGATCTGCCACCATGAAGCCCATCAACCTCTCTCAT 3'

3 RITA : 5' CGGAATTCTTACCCAGCGCAACGCCTC 3'

40 Se insertó una secuencia Kozak dentro del cebador en el sentido de 5' y se insertó un codón de parada en el cebador en el sentido de 3'.

Tras la digestión con Bgl II/EcoRI se insertó el producto de PCR dentro de TRIP ΔE IRES-GFP dentro de los sitios de BamHI/EcoRI.

45

Figura 8: capacidad de transducción del vector positivo de ADN tricatenario derivado de VIH que codifica para el péptido de epítomo I9V (derivado de pol VIH-1) y GFP de células dendríticas murinas que se produjeron utilizando células de médula ósea de ratones transgénicos HHD. Se transdujeron aproximadamente el 80% de las células dendríticas murinas mediante el vector recombinante positivo tricatenario derivado de VIH tal como se documenta en los análisis FACS de expresión de GFP intracelular.

50

Figura 9: evaluación de las respuestas de LTC en ratones HHD después de la inmunización con el vector TRIP-des-IRES-GFP que codifica para el gen DES de *Mycobacterium tuberculosis*.

55 Figura 10: mapa de restricción de pTRIP.DES-IRES-GFP depositado en la CNCM el 11 de octubre de 1999.

Ejemplos

Los vectores lentivirales tienen la capacidad de transducir células, incluyendo células que no se dividen, y se proponen de manera creciente para la terapia génica. Recientemente, se mostró que los lentivirus que contienen la secuencia de acción en cis del tracto de polipurina (ADN tricatenario central) muestran una transducción más eficaz

60

de células murinas y humanas que aquellos con el ADN tricatenario central eliminado (Charneau P. et al, J. Mol. Biol. 1994, 241, 651-662). Se han probado ahora los vectores lentivirales que contienen o no ADN tricatenario central y que codifican para los mismos múltiples epítomos de LTC de melanoma restringido por HLA-A2.1 para determinar sus capacidades para inducir respuestas de LTC. La administración directa *in vivo* del vector lentiviral que contiene ADN central indujo respuestas de LTC fuertes frente a todos los péptidos epítomos codificados por las secuencias de múltiples epítomos en ratones HHD de "HLA-A2.1 pura". Se mostró una clara ventaja para el vector lentiviral que contiene el ADN tricatenario. Además, se mostró que el vector lentiviral que contiene el ADN tricatenario transduce las células dendríticas humanas de manera hasta 7 veces más eficaz que el vector que no contiene el ADN tricatenario. Estas células dendríticas transducidas *ex vivo* provocaron respuestas de LTC primarias específicas eficaces frente a la mayoría de los péptidos epítomos de melanoma. Ya que ha sido resuelto en mayor parte el asunto de la seguridad del vector lentiviral modificado, se propone el uso de ese vector no solo para terapia génica humana *in vivo*, sino también para inmunoterapia de pacientes con cáncer.

Introducción

La subclase lentiviridae de retrovirus puede infectar a la mayoría de los tipos de células incluyendo las células que no se dividen. Esta propiedad hace a los lentivirus atractivos para la terapia génica. Ya se han construido varios vectores lentivirales recombinantes de replicación defectuosa por diferentes grupos (Naldini PNAS 93, 11382-8, Science, 1996). Estos vectores lentivirales destoxificados y creados de nuevo por ingeniería se proponen como los vectores de terapia génica más eficaces y seguros (Zufferey R, y Kim V.N. J Virol, 72, 9873-80, 1998). Se desarrolló un vector basado en VIH lentiviral humano, pseudotipado con glucoproteína G de virus de estomatitis vesicular (VSVG) (Bums J.C., 1993 PNAS 90, 8033-7). Este vector se suprimió para la mayoría de las proteínas virales no esenciales pero contiene una secuencia de acción en cis del tracto de polipurina (cPPT, ADN tricatenario central). El ADN tricatenario central aumenta de manera considerable la importación nuclear de moléculas de ADN de VIH retrotranscritas. Además, se observó que el vector lentiviral que contiene el ADN tricatenario central presenta una transducción más eficaz de células murinas y humanas *in vitro* que el vector que no contiene el ADN tricatenario.

La solicitud WO98/39463 describe vectores con proteínas no esenciales eliminadas, en el estudio de la transducción celular, y demuestra que la eliminación de la mayoría de las proteínas no esenciales no alteró la transducción ni la importación nuclear del genoma viral y su integración. Menciona que algunos otros factores deben mediar la transferencia del complejo de preintegración en el núcleo, y que esta función parece retenerse en los genes gag, pol, tat o rev. No se indicó ni la naturaleza del factor, ni su ubicación.

El ratón transgénico HHD de "HLA-A2.1 pura" (Pascolo et al., J. Exp. Med., 1997, 185: 2043-2051) permite una evaluación controlada de manera experimental del potencial inmunógeno de péptidos epítomos y de varias estrategias de inmunización. Utilizando estos ratones HHD, se ha informado de la capacidad de múltiples epítomos de melanoma codificados por diferentes vectores recombinantes para inducir repuestas de LTC simultáneas en un único animal. Se ha estudiado en primer lugar la capacidad de los vectores lentivirales que contienen o no ADN tricatenario central y que codifican para los mismos múltiples epítomos de melanoma para la inducción de LTC *in vivo* en ratones transgénicos HHD. Además, también se investigó si las células dendríticas humanas (DCh) transducidas mediante los mismos vectores lentivirales recombinantes inducen repuestas de LTC primarias frente al motivo de múltiples epítomos de melanoma *ex vivo*. Los presentes resultados demuestran que el ADN tricatenario aumenta de manera significativa la capacidad del vector lentiviral para inducir repuestas de LTC específicas *in vivo* mediante la administración directa de los vectores recombinantes o *ex vivo* utilizando las células dendríticas transducidas.

Datos comparativos

Ejemplo I: Inmunización de múltiples epítomos de melanoma

Tras establecer que la inyección de ADN recombinante que codifica para un motivo de múltiples epítomos derivado de melanoma puede provocar repuestas de LTC simultáneas frente a varios epítomos de melanoma en ratones HHD, se probó la capacidad inmunógena de un vector lentiviral que codifica para el mismo motivo de múltiples epítomos de melanoma (fig. 1 y tabla 1). Se administró un vector TRIP-mel-IRES-GFP (CNCM I-2185 depositado el 20 de abril de 1999) a 1,25 μ g/p24 por ratón por vía intravenosa, intraperitoneal o subcutánea. Se usaron al menos 3 ratones por grupo.

Se indujeron simultáneamente repuestas de LTC específicas múltiples frente a la mayoría de los diez epítomos de melanoma. Se observaron repuestas de LTC similares independientemente de la vía de administración frente a ambos péptidos cargados (tabla 2) y células HeLa transfectadas de HHD, transducidas de TRIP-mel-IRES-GFP (valores no mostrados). Sin embargo, la inyección intraperitoneal indujo repuestas de LTC levemente mejores. Se provocaron repuestas fuertes frente a péptidos epítomos NA17-A.nt38 y gp100.154. También se observaron repuestas significativas frente a gp100.457, MART.1.27, Mage-3, y Tirosinasa.368-D. Las repuestas de LTC fueron débiles frente a gp100.209, gp100.280, MART-1.32, y Tirosinasa.1. Los epítomos que provocan repuestas de LTC débiles seguidas de inmunización del vector TRIP-mel-IRES-GFP caen todos en los grupos de no inductores de LTC cuando se administran utilizando otros vectores no lentivirales.

Dosis mínima de vector lentiviral requerida para la inducción de LTC detectable *in vivo*

Se determinó la dosis mínima de vector lentiviral que provoca una respuesta de LTC significativa en ratones HHD utilizando inyecciones intraperitoneales del vector TRIP-mel-IRES-GFP en seis dosis diferentes utilizando 4 ratones por dosis. Se llevaron a cabo dos experimentos en los cuales se mezclaron células efectoras de dos ratones para tener razones similares E/T justo antes del ensayo de ⁵¹Cr. Se probaron en la mayoría de los experimentos respuestas de LTC frente a todos los péptidos epítomos de melanoma. Debido a que los resultados fueron altamente similares y muy homogéneos, se tuvieron en cuenta solamente las respuestas de LTC frente al péptido epítomo NA17/A para comparar la relación "dosis-efecto" por el bien de la claridad y simplicidad. Se obtuvieron las mejores respuestas de LTC utilizando dosis de entre 500 ng y 2500 ng/p24 por ratón (tabla 2). Aunque se obtuvieron repuestas de LTC detectables frente a algunos de los epítomos de melanoma, altas dosis de lentiviral no indujeron mejores respuestas de LTC que las dosis bajas. Incluso aunque se pusieron en evidencia algunas respuestas de LTC específicas frente a algunos péptidos epítomos de melanoma, dosis inferiores a 500 ng/p24 por ratón no fueron suficientes para inducir respuestas de LTC eficaces. Debe observarse que en dosis de 1250 ng/p24 por ratón algún ratón generó respuestas de LTC frente a diez de los diez epítomos incluidos en el motivo de múltiples epítomos (fig. 3).

Inducción de LTC de memoria a largo plazo

Se inyectaron a ocho ratones con el vector TRIP-mel-IRES-GFP. Se sacrificaron los ratones o bien 12 días o bien 5 meses después de la inmunización. Tras 5 días después de la estimulación *in vitro* con los péptidos epítomos de melanoma y dos días adicionales con TCGF al 10%, se mezclaron las células efectoras de los cuatro ratones y se probaron frente a células RMA8 transfectadas de HHD cargadas con péptidos. Se evidenciaron las respuestas de LTC específicas para todos los péptidos epítomos de melanoma menos para gp100.209 y Mart1.32 en ratones inmunizados 12 días antes. Cinco meses después de la inyección del TRIP-mel-IRES-GFP, todavía indujeron respuestas de LTC fuertes todos los epítomos inductores de LTC primarios (fig. 2). Fue sorprendentemente comparable el nivel de las respuestas de LTC 12 días o 5 meses después de la inmunización de los ratones. Esto sugiere que las células transducidas *in vivo* mediante el vector lentiviral no se destruyen por el sistema inmunitario y continúan produciendo los múltiples epítomos de melanoma codificantes.

Función del ADN tricatenario central para la inmunización *in vivo*

Se inmunizaron individualmente ratones HHD con los vectores TRIP-mel-IRES-GFP y HR-mel-IRES-GFP al mismo tiempo administrados por vía intraperitoneal en dosis de 800 ng, 200 ng, 50 ng, 12 ng, y 3 ng/p24 por ratón. Se probaron al menos cuatro ratones para cada dosis en dos experimentos separados. Tras la estimulación *in vitro* mediante péptidos sintéticos, se probó la capacidad citolítica de células de bazo utilizando células diana RMA8-HHD impulsadas por péptido. Debido a que los resultados fueron altamente homogéneos, se probaron solamente las respuestas de LTC frente a péptido epítomo NA17/A, Mart-1.27, gp100.154, y Tirosinasa.368-D por el bien de la claridad y simplicidad.

Se ilustran los resultados en la tabla 3. En general, los ratones inmunizados con el vector TRIP-LV en dosis de 800 ng, 200 ng, y 50 ng/p24 por ratón, provocaron repuestas de LTC mejores que los ratones inmunizados con el vector HR-LV. Independientemente de los vectores utilizados no hubo respuesta de LTC detectable en dosis inferiores a 12 ng/p24 por ratón (valores no mostrados). Esto confirma la capacidad de transducción mejorada de los vectores lentivirales que contienen el complejo de ADN central en comparación con aquellos que carecen de este complejo.

Transducción de células dendríticas mediante vectores lentivirales

Se observó inicialmente que las células tumorales tales como células MT4 y HeLa pueden transducirse de manera hasta 30 veces más eficaz mediante el vector lentiviral que contiene el ADN tricatenario central que mediante el vector que carece de ADN tricatenario central. Se probó entonces la capacidad de transducción de estos dos vectores lentivirales en diferentes concentraciones en DC de donantes sanos o de ratones HHD. Se midieron el porcentaje de DC que expresa GFP y su intensidad de fluorescencia media mediante FACS y se consideraron como el nivel de transducción de DC mediante los dos vectores lentivirales.

El vector TRIP-GFP transdujo las células de manera más eficaz que el vector HR-GFP en todas las concentraciones de vector. La expresión de GFP de DC murina y humana transducida mediante el vector TRIP-GFP fue respectivamente hasta 3 y 7 veces más alta que la expresión de aquellas transducidas mediante el vector HR-GFP (fig. 3).

Inducción de LTC primaria utilizando células dendríticas humanas transducidas mediante el vector TRIP mel IRES-GFP

Se estimularon *in vitro* células mononucleares (MNC) obtenidas de donantes de HLA-A2.1 sanos una vez a la semana utilizando las DC del mismo donante transducidas mediante TRIP mel-IRES-GFP. Se analizó la presencia de la expresión de GFP en las células dendríticas mediante FACS para verificar la transducción eficaz. Después de

tres semanas, se probó la capacidad citotóxica de las MNC en un ensayo de ^{51}Cr utilizando células T2 impulsadas por péptido como dianas en condiciones de cultivo libre de FCS.

- 5 Las DCh transducidas con el vector TRIP-mel-IRES-GFP indujeron respuestas de LTC significantes frente a todos los péptidos epítomos de melanoma menos Mart1.31, mientras que las DCh no transducidas indujeron sólo respuestas de fondo habituales (fig. 4).

Discusión

- 10 Recientes informes muestran que los vectores derivados de lentivirus defectuosos de replicación pueden transducir una variedad de células que no se dividen (Naldini, 1996, Kafri, 1997). Los lentivirus pueden entrar a través de la membrana celular intacta de células que no se dividen (Case, 1999). Se ha evidenciado ahora que este procedimiento se organiza de manera larga mediante una secuencia de acción en cis del tracto de polipurina, denominada el ADN tricatenario central. La introducción de esta secuencia dentro de los vectores derivados de
15 lentiviral permitió una transducción estable *ex vivo* e *in vivo* de hasta 30 veces más alta de varios tipos de células que incluyen neuronas, hepatocitos, y células progenitoras/madre hematopoyéticas.

- Recientemente, se ha logrado un progreso para tratar el asunto de la seguridad de vectores derivados de lentivirus y su uso en terapia génica (Narry Kim V et al 1988, Zufferey, 1999). Sin embargo, no se han estudiado nunca los
20 vectores lentivirales para aplicaciones inmunoterapéuticas para las que se utilizaron con éxito el vector retroviral murino clásico y vectores no retrovirales (Condon, 1996, Song 1997, Specht, 1997). Para desarrollar una estrategia de vacunación potente, se ha probado la capacidad inmunógena de un vector lentiviral que contiene el ADN tricatenario central y que codifica para múltiples epítomos de melanoma. Se estudió primero la inyección directa de este vector para someter a ensayo si puede provocar respuestas de LTC específicas *in vivo* frente a los epítomos de
25 melanoma. Se compararon previamente varias estrategias de inmunización en ratones HHD transgénicos de HLA-A2.1 "pura". Utilizando ADN de pCMV-B10 (HBs) recombinante o vacunas recombinantes que codifican para los mismos múltiples epítomos de melanoma, fue posible inducir de manera simultánea, en un solo ratón, respuestas de LTC frente a cuatro de seis péptidos diferentes incluidos en el polipéptido de melanoma. Se obtuvieron mejores resultados de manera significativa para el vector TRIP mel IRES-GFP que codifica para los mismos múltiples
30 epítomos de melanoma que para otros vectores que codifican para el mismo motivo de múltiples epítomos en cuanto a la lisis específica pero además en cuanto al número de péptidos que provocan repuestas de LTC. De manera particular, la inyección por vía subcutánea e intraperitoneal del vector indujeron en algunos ratones respuestas de LTC frente a todos los epítomos codificados por el vector TRIP mel IRES-GFP.

- 35 Varios grupos informaron que pueden utilizarse las células dendríticas que son transducidas o cargadas con péptido como un enfoque de inmunización potente frente a una variedad de células cancerígenas (Mayordomo, JI, 1995, Song W, 1997, Specht, JM, 1997). Para el fin de esta invención, se ha estudiado por tanto si las células dendríticas humanas o murinas pueden transducirse de manera eficaz e inducir respuestas de LTC primarias *in vitro*. Los presentes resultados demuestran de manera clara que estas células pueden transducirse fácilmente. Además, estas
40 células transducidas presentaron todos los epítomos codificados por el vector lentiviral recombinante. De manera interesante, probablemente las células dendríticas humanas fueron transducidas de la manera más fácil. La transducción *in vitro* de las células evita a los vectores lentivirales integrar su genoma dentro de una variedad de células huésped de manera peligrosa. Por esta razón, las células transducidas *in vitro* debe constituir un método de administración seguro y apropiado para una primera aplicación clínica.

- 45 Warner et al fueron los primeros que mostraron la capacidad del vector retroviral para inducir respuestas de LTC eficaces en varios modelos de animales, pero además en pacientes con VIH utilizando fibroblastos transducidos de vector retroviral murino que expresan proteínas VIH-1 (revisado por Warner 1998). Se detectaron ADN provirales en células dendríticas que presentan antígenos de manera eficaz, inyectado directamente en el ratón (Song, 1997). Sin
50 embargo, en contraste con los vectores lentivirales, los vectores retrovirales murinos no pueden transducir células que no se dividen tales como DC y la expresión *in vivo* del gen codificante se somete a menudo a un "apagado" ("shut off"). Consecuentemente, estos vectores retrovirales no son los mejores candidatos para la inmunoterapia humana (Kafri).

- 55 Los resultados demuestran de manera clara que los vectores derivados de lentiviral que contienen el ADN tricatenario central inducen respuestas de LTC más fuertes *in vivo* en ratones HHD que aquellos que no contienen el ADN tricatenario central. Además, el vector lentiviral que contiene el ADN tricatenario central puede transducir fácilmente DCh *in vitro* lo que puede utilizarse posteriormente para inmunoterapia clínica.

60 Materiales y Métodos

Construcciones de vector lentiviral

- Plásmidos de vector: pTRIP-EGFP derivado de HR'CMVLacZ (Naldini et al, PNAS 93,11382-8, 1996). El gen
65 indicador de LacZ se sustituyó por el gen EGFP (Clontech). Se insertó el gen EGFP en TRIP-EGFP, en el sitio Clal de un fragmento central de VIH-1LAI que comprende las secuencias cPPT y CTS.

Se amplificó el gen EGFP mediante PCR utilizando Pfu polimerasa (Stratagene) del plásmido pEGFP-N1, añadiendo los sitios de restricción BamHI y XhoI en sentido de 5' y 3' respectivamente. Los cebadores de PCR fueron como siguen:

Bam GFP 5' CC GGATCC CCA CCG GTC GCC ACC 3'

Xho GFP 5' CC CTCGAG CTA GAG TCG CGG CCG 3'

5 Se construyó el vector HR GFP volviendo a clonar este fragmento de PCR en los sitios BamHI y XhoI de pHR'CMVLacZ, sustituyendo LacZ ORF por EGFP.

10 Se amplificó un fragmento de 178 pb de pLAI3 (4793 a 4971), que engloba cPPT y CTS, mediante PCR. Se añadieron los sitios de restricción de NarI en el sentido de 5' de los cebadores con el propósito de insertar este fragmento dentro del sitio ClaI único de HR GFP:

**Nar TRIP+: 5' GTC GTC GGCGCC GAATTC ACA AAT GGC AGT ATT CAT CC
3'**

Nar TRIP-: 5' GTC GTC GGCGCC CCA AAG TGG ATC TCT GCT GTC C 3'

15 La inserción de esta secuencia tricatenaria en la orientación correcta dio una elevación del vector del plásmido TRIP GFP, y TRIPinv GFP en la orientación inversa. Alternativamente, se amplificó el mismo fragmento tricatenario de los plásmidos pcPPT-AG, pcPPT-D, pcPPT-225 y pCTS para generar vectores que incluyen las mismas mutaciones en el cPPT o en el CTS tal como los virus correspondientes.

20 En primer lugar, se rellenó el sitio EcoRI presente en el vector TRIP GFP o TRIP-EGFP (depositado en la CNCM bajo el nº I-2005 el 15 de abril de 1998), creando el vector TRIP GFP ΔE. Entonces se clonó en el sentido de 5' del EGFP un fragmento de BamHI/XhoI de 1,2 Kb que contiene el sitio de entrada del ribosoma interno (IRES) de un picornavirus en lugar del BamHI/XhoI EGFP de 0,7 Kb en un vector TRIP GFP ΔE, creando el vector TRIP ΔE IRES GFP. Los sitios presentes entre el promotor CMV y la secuencia de IRES GFP son BamHI-BstXI-SnaBI y EcoRI. Se generó un fragmento de melanoma (mel) de múltiple epítipo LTC mediante PCR en el pBS mel poly, insertando una secuencia consenso de kozac dentro de los cebadores 5BgIMlu Mel:

5'CCAGATCTACGCGTGCCACCATGGCTGCTGGT 3'

3RIMel: 5'CGGAATTTCGACCTAAACGCAACGGATG3'.

30 Se digirió el fragmento de PCR de mel mediante BgIII/EcoRI y se insertó en los sitios BamHI/EcoRI de TRIP ΔE IRES GFP, creando el TRIP ΔE mel IRES GFP también llamado TRIP mel IRES GFP.

35 Se creó el HR mel IRES GFP intercambiando el fragmento de NdeI/XhoI que contiene los múltiples epítipos de melanoma y el IRES GFP de TRIP mel IRES GFP con el de HR GFP. Se sitúa el sitio NdeI en el extremo del promotor CMV.

Producción de vectores virales.

40 Se produjeron los vectores lentivirales tal como se describió anteriormente (Naldini I.M. PNAS 1996 y science 1996) mediante una transfección transitoria de células 293T con plásmido ramificado utilizando la técnica de calcio-fosfato. Brevemente, se transfectaron las células 293T con 20 µg del plásmido de envuelta de VEV (pMDG) y 40 µg de varios acondicionamientos (8.2 ó 8.91) y plásmidos de vector lentiviral. Se recogieron medios condicionados 60 h y 84 h después de la transfección. Entonces se concentró el virus y se trataron los dNTPs tal como se describió anteriormente (Naldini science 1996). Se determinaron las titulaciones virales en células HeLa P4.2 y células MT4
45 mediante dilución seriada y por ensayo ELISA p24 (Naldini Science 1996).

50 Se llevó a cabo una titulación de ciclo de virus por triplicado mediante infección de células P4 situadas en placas de 96 pocillos, con cantidades equivalentes de partícula (1 ng de antígeno viral p24 por pocillo), en presencia de 20 µM de DEAE-dextrano. Se añadió el inhibidor de proteasa Saquinavir (Roche) a 1 µM en todo el experimento, para restringir el análisis a un único ciclo de infección. Se inhibió la mitosis celular mediante el tratamiento con aphidicolin (8 µM), el día anterior a la infección. Se midió la actividad β-galactosidasa 48 h después de la infección utilizando un ensayo de gen indicador de β-Gal quimioluminiscente (Boehringer).

55 Se infectaron las células HeLa por triplicado con la cantidad equivalente de partículas de vector (5 ng de p24 por pocillo). A las 48 horas después de la transducción, se sustituyó el medio por 200 µl de TNB (Tris 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM) y se cuantificó la fluorescencia de las células vivas utilizando un fluorímetro de microplaca (Victor2,

Wallac) y filtros adaptados de EGFP (excitación: 485 nm, emisión: 520 nm).

Ratones. Se han descrito anteriormente los ratones HHD (Pascolo, 1997). Estos expresan una molécula de clase I de histocompatibilidad de cadena sencilla transgénica en la que el C terminal de la b2m humana se une covalentemente mediante un brazo peptídico (GGGGS) x 3 al N terminal de una cadena pesada quimérica (HLA-A2.1 a1-a2, H-2D^b a3-transmembrana, y dominios intracitoplásmicos). Se han interrumpido adicionalmente el *H-2D^b* y los genes *b2m* de ratón de estos ratones mediante recombinación homóloga dando como resultado una ausencia completa de expresión en superficie de células detectable serológicamente de moléculas de clase I de histocompatibilidad de ratón.

Generación de DCh e inducción de LTC primaria.

Se obtuvieron células dendríticas humanas a partir de productos de citaféresis de donantes sanos de haplotipo de HLA-A2.1 (IDM, París, Francia). El análisis FACS de estas DC utilizando mAbs frente a CD3, CD14, CD83, CD83, HLA-ABC, y HLA-DR mostró el fenotipo de DC inmaduro. Se transdujeron las DCh en 1 ml de medio de cultivo AMV-5 con los vectores lentivirales en concentraciones de 600 ng, 300 ng, 150 ng, y 150 ng/p24 por 1×10^6 células durante 10 días. Se midieron el porcentaje y la intensidad de fluorescencia media de la expresión de GFP en DCh transducida con los dos vectores lentivirales mediante FACS (Becton Dickinson, BD, EE.UU). Se estimularon células mononucleares (MNC) del mismo donante *in vitro* mediante la DCh o la DCh transducida con una razón de 4 MNC con respecto a 1 DCh. Se volvieron a estimular las MNC dos veces utilizando la misma DCh transducida-crioconservada y después se comprobó la actividad citolítica en un ensayo de liberación de ⁵¹Cr durante 4 h, utilizando como dianas células T2 cargadas con péptidos de control negativo o relevante (Inf.m.58) (10 µg/ml, 5×10^6 células/ml, en medio RPMI libre de FCS, 2 h a TA).

Generación de células dendríticas murinas

Se generaron células dendríticas derivadas de médula ósea tal como se describió anteriormente [43, 51]. Se cultivaron las células mononucleares de médula ósea en medio RPMI complementado con FCS al 10%, L glutamina 2 mM, 50 U/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomina, 2-mercaptoetanol 5×10^{-5} M (medio RPMI completo), complementado adicionalmente con 20 ng/ml de GM-CSF de ratón recombinante y 100 ng/ml de IL4 de ratón recombinante (ambos de GENZYME, Cambridge, MA). Se retiraron cuidadosamente las células no adherentes, en el día 2 y 6, y se añadió medio RPMI completo nuevo, complementado con 10 ng/ml de GM-CSF de ratón y 50 ng de IL4 de ratón. Se sustituyó el medio de cultivo en el día 7 por 1 ml de medio RPMI completo complementado con los vectores lentivirales a concentraciones de 600 ng, 300 ng, 150 ng, y 150 ng/p24 por 1×10^6 células. Las células dendríticas recogidas en el día 9 tenían una pureza de más del 95% (IA^{b+}, HHD⁺, CD3⁻, 33D1⁺, NDL145⁺, y CD11c⁺), tal como se ensayó con mAb apropiado. Entonces se midió el porcentaje y la intensidad media de fluorescencia de la expresión de GFP en DC murina en los días 9 y 12 mediante FACS.

Ensayos citolíticos y de reestimulación *in vitro* y de inmunización del vector

Se inyectaron vectores lentivirales en ratones HHD bien por vía intraperitoneal, por vía intravenosa o bien por vía subcutánea durante 12 días. Entonces se volvieron a estimular de manera individual las células del bazo de ratones cebados en medio RPMI completo mediante cada péptido epítipo durante siete días. En los dos últimos días, se volvieron a estimular las células cultivadas mediante TCGF al 10%. En el día 7 se comprobó la actividad citolítica de las células cultivadas tal como ya se ha descrito (Pascolo, 1997), en un ensayo de liberación de ⁵¹Cr durante 4 h, utilizando como dianas células TAP-RMA-S transfectadas con HHD cargadas con péptidos de control negativo o relevante (Inf.m.58) (10 µg/ml, 5×10^6 células/ml, en medio RPMI libre de FCS, 2 h a TA). Se utilizaron paralelamente como células diana las células HeLa transfectadas con HHD transducidas o no con TRIP-mel-ITES-GFP. Se calculó el porcentaje de lisis específica tal como sigue: (liberación experimental – liberación espontánea) / (liberación total – liberación espontánea) x 100.

Ejemplo II. Evaluación de respuestas LTC en ratones HHD tras la inmunización con el vector TRIP-des-IRES-GFP que codifica para el gen DES de *Mycobacterium tuberculosis*.

El gen DES se describe en el documento WO 98/04711.

Procedimiento experimental

En una primera etapa, se utilizaron los vectores TRIP-des-IRES-GFP para transducir las células HeLa-HDD. Estas células se transdujeron y se clonaron limitando la dilución. Se seleccionó el clon que expresó el nivel más alto de GFP para utilizarlo como células diana en pruebas de LTC de ⁵¹Cr clásicas.

En una segunda etapa, se inyectaron ratones HDD por vía intraperitoneal utilizando 1,2 µg/p24 por ratón de las partículas de vector TRIP-des-IRES-GFP. Se estimularon *in vitro* células del bazo de estos ratones 12 días después de la inyección con o bien 0,2 µg o 1 µg/p24/ml (2×10^6 células por ml) de partículas de vector o bien con blastocitos

5 singénicos estimulados con LPS, transducidos con TRIP-des-IRES-GFP con $1 \mu\text{g/p24/ml}/2 \times 10^6$ células/ml. Seis días después de la estimulación *in vitro*, se comprobó la capacidad citolítica de las células en un ensayo de ^{51}Cr utilizando células diana HeLa-HDD transducidas con des. Las células diana de control fueron células HeLa-HDD transducidas por el múltiple epítipo de melanoma (TRIP-mel-IRES-GFP).

5 Resultados

10 Estos experimentos se han realizado para estudiar si los vectores positivos tricatenarios derivados de VIH que codifican para un gen completo son capaces de transducir células y de inducir respuestas específicas de LTC frente a las células diana que expresan el mismo gen. Tal como se ilustra en la figura 9, se obtiene una lisis específica en todas las condiciones. Los blastocitos de LPS transducidos indujeron respuestas de LTC débiles. Se obtuvieron los mejores resultados utilizando $1 \mu\text{g/p24/ml}$ de partículas de vector. Estos resultados muestran que puede introducirse un gen completo en el genoma de la célula huésped y se procesa y presenta su producto, e induce respuestas de LTC significativas. Estos resultados también demuestran que el gen des contiene al menos uno o más péptidos epítipos de LTC restringidos por HLA-A2.1.

15 **Referencias**

20 1. Naldini, L., Blomer, U., Gage, F.H., Trono, D. & Verma, I.M. Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 11382-8 (1996).

25 2. Naldini, L. Lentiviruses as gene transfer agents for delivery to non-dividing cells, *Current Opinion in Biotechnology* 9, 457-63 (1998).

3. Zufferey, R., Dull, T., Myel, R.J., Bukovsky, A., Quiroz, D., Naldini, L. et al. Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient *in vivo* gene delivery. *Journal of Virology* 72, 9873-80 (1998).

30 4. Burns, J.C., Friedmann, T., Driever, W., Burrascano, M. & Yee, J.K. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells [see *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 8033-7 (1993)].

35 5. Charneau, P., Mirambeau, G., Roux, P., Paulous, S., Buc, H. & Clavel, F. HIV-1 reverse transcription. A termination step at the center of the genome. *Journal of Molecular Biology* 241, 651-62 (1994).

40 6. Pascolo, S., Bervas, N., Ure, J.M., Smith, A.G., Lemonnier, F.A. & Pérarnau, B. HLA-A2.1-restricted education and cytolytic activity of CD8+ T lymphocytes from $\beta 2$ microglobulin ($\beta 2\text{m}$) HLA-A2.1 monochain transgenic H-2Db $\beta 2\text{m}$ double knockout mice *J. Exp. Med.* 185, 2043-2051 (1997).

7. Koenig, S., Gendelman, H.E., Orenstein, J.M., Dal Canto, M.C., Pezeshkpour, G.H., Yungbluth, M. et al. Detection of AIDS virus in macrophages in brain tissue from AIDS patients with encephalopathy. *Science* 233, 1089-93 (1986).

45 8. Roe, T., Reynolds, T.C., Yu, G. & Brown, P.O. Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. *EMBO Journal* 12, 2099-108 (1993).

50 9. Michel, M.L., Davis, H.L., Schleef, M., Mancini, M., Tiollais, P. & Whalen, R.G. DNA-mediated immunization to the hepatitis B surface antigen in mice: aspects of the humoral response mimic hepatitis B viral infection in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 5307-11 (1995).

10. Giovannangeli, C., Diviacco, S., Labrousse, V., Gryaznov, S., Charneau, P. & Helene, C. Accessibility of nuclear DNA to triplex-forming oligonucleotides: the integrated HIV-1 provirus as a target. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 79-84 (1997).

55 11. Kim, V.N., Mitrophanous, K., Kingsman, S.M. & Kingsman, A.J. Minimal requirement for a lentivirus vector based on human immunodeficiency virus type 1. *Journal of Virology* 72, 811-6 (1998).

60 12. Fox, J.L. Researchers wary of fear-based ban on lentivirus gene therapy [news]. *Nature Biotechnology* 16, 407-8 (1998).

13. Dull, T., Zufferey, R., Kelly, M., Myel, R.J., Nguyen, M., Trono, D. et al A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *Journal of Virology* 72, 8463-71 (1998).

65 14. Arya, S.K., Zamani, M. & Kundra, P. Human immunodeficiency virus type 2 lentivirus vectors for gene transfer: expression and potential for helper virus-free packaging. *Human Gene Therapy* 9, 1371-80 (1998).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> INSTITUT PASTEUR
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

5 <120> VECTORES PARA LA PREPARACIÓN DE COMPOSICIONES INMUNOTERAPÉUTICAS

<130> B4408B_AD/LV/KN

10 <140> AÚN NO ASIGNADO
<141> 19-11-2009

<150> EP 99402492.5
<151> 11-10-1999

15 <160> 11

<170> PatentIn ver. 2.1

20 <210> 1
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido

<220>
<221> misc_feature

30 <222> (1)..(39)
<223> Cebador

<400> 1
tcagatctgc caccatggca ctaacagaag taataccac 39

35 <210> 2
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido

<220>
<221> misc_feature

45 <222> (1)..(30)
<223> Cebador

<400> 2
cggaattctt attgccttg ccctgcttc 30

50 <210> 3
<211> 38
<212> ADN

55 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido

60 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(38)
<223> Cebador

65 <400> 3
gaagatctgc caccatgaag cccatcaacc tctctcat 38

ES 2 447 115 T3

<210> 4
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido
 <220>
 10 <221> misc_feature
 <222> (1)..(27)
 <223> Cebador
 <400> 4
 15 cggaattctt acccagcgca acgctc 27
 <210> 5
 <211> 23
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido
 <220>
 25 <221> misc_feature
 <222> (1)..(23)
 <223> Cebador
 <400> 5
 30 ccggatcccc accggtcgcc acc 23
 <210> 6
 <211> 23
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido
 40 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(23)
 <223> Cebador
 45 <400> 6
 ccctcgagct agagtcgegg ccg 23
 <210> 7
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 55 <223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(38)
 60 <223> Fragmento de triple cadena
 <400> 7
 gtcgtcggcg ccgaattcac aaatggcagt attcatcc 38
 65 <210> 8
 <211> 34

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(34)
 10 <223> Fragmento de triple cadena

 <400> 8
 gtcgtcggcg ccccaaagtg gatctctgct gtcc 34

 15 <210> 9
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido

 <220>
 <221> misc_feature
 25 <222> (1)..(32)
 <223> Cebador

 <400> 9
 ccagatctac gcgtgccacc atggctgctg gt 32
 30
 <210> 10
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido

 <220>
 40 <221> misc_feature
 <222> (1)..(27)
 <223> Cebador

 <400> 10
 45 cggaattcga cctaaacgca acggatg 27

 <210> 11
 <211> 92
 <212> PRT
 50 <213> humano

 <220>
 <221> PÉPTIDO

 55 <222> (1)..(92)
 <223> epítipo de melanoma

 <400> 11

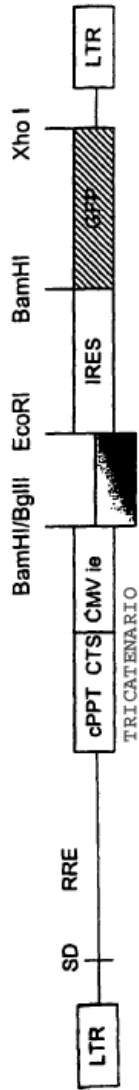
ES 2 447 115 T3

Ala Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val Phe Leu Trp Gly Pro Arg Ala
1 5 10 15
Leu Val Met Leu Leu Ala Val Leu Tyr Cys Leu Leu Leu Asp Gly Thr
20 25 30
Ala Thr Leu Arg Leu Lys Thr Trp Gly Gln Tyr Trp Gln Val Tyr Met
35 40 45
Asp Gly Thr Met Ser Gln Val Ile Thr Asp Gln Val Pro Phe Ser Val
50 55 60
Tyr Leu Glu Pro Gly Pro Val Thr Ala Ile Leu Thr Val Ile Leu Gly
65 70 75 80
Val Leu Val Leu Pro Asp Val Phe Ile Arg Cys Val
85 90

REIVINDICACIONES

1. Uso de:
- 5 a) un transgén que codifica para uno o varios epítomos de carcinomas, leucemia o linfoma, situado bajo el control de señales reguladoras de transcripción y expresión,
- b) una secuencia que contiene señales reguladoras de retrotranscripción, expresión y encapsidación de origen retroviral o similar a retroviral, y
- 10 c) regiones de iniciación central de acción en *cis* (cPPT) y de terminación de acción en *cis* (CTS) que pueden adoptar una estructura de tres cadenas tras transcripción inversa, siendo estas regiones de origen lentiviral, en la preparación de un vector.
2. Uso según la reivindicación 1, en el que dichos uno o varios epítomos codifican de 8 a 15 aminoácidos, preferentemente de 9 a 12 aminoácidos.
- 15 3. Uso según la reivindicación 1 o 2, en el que dichos epítomos de carcinomas son de carcinomas renales, carcinomas de vejiga, carcinomas de colon, carcinomas de pulmón o cáncer de mama.
4. Uso según la reivindicación 1, en el que dichas secuencias de señales reguladoras de origen retroviral se derivan de un genoma de lentivirus.
- 20 5. Uso según la reivindicación 1, en el que dichas secuencias de señales reguladoras de origen similar a retroviral se derivan de un retrotransposón.
6. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho transgén está contenido en un casete de expresión que incluye señales reguladoras de transcripción y expresión.
- 25 7. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dichas señales reguladoras de retrotranscripción, expresión y encapsidación son de origen lentiviral, y dichas regiones de cPPT y de CTS son de origen lentiviral.
- 30 8. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dichas señales reguladoras de retrotranscripción, expresión y encapsidación y dichas regiones de cPPT y de CTS, se derivan de un lentivirus seleccionado de CAEV, EIAV, VISNA, VIH, VIS o VIF.
- 35 9. Uso según la reivindicación 8, en el que dichas señales reguladoras de retrotranscripción, expresión y encapsidación y dichas regiones de cPPT y de CTS se derivan de un retrovirus de tipo VIH, en particular VIH-1 o VIH-2.
- 40 10. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dichas regiones de cPPT y de CTS tienen una localización central dentro de la secuencia del vector.
11. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dicho transgén se inserta en la región U3 de las señales de regulación para retrotranscripción.
- 45 12. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que dicho vector es adecuado para inducir o estimular una respuesta inmune mediada por células contra uno o varios epítomos codificados por dicho transgén.
13. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 11, en el que dicho vector es adecuado para inducir o estimular una respuesta inmune mediada por células contra todos o la mayoría de los epítomos contenidos en el poliepítomo.
- 50 14. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que dicho vector es adecuado para inducir o estimular una respuesta inmune mediada por células contra el tumor que expresa dichos uno o varios epítomos.
- 55 15. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en el que dicha respuesta inmune es una respuesta de linfocitos T citotóxicos (CTL) o una respuesta de CD4.

Figura 1: vector recombinante positivo de ADN central derivado VIH-1 que codifica para múltiples epítomos de melanoma



Secuencia de múltiples epítomos de melanoma

AAGIGILTVFLWGPRLVMLLAVLYCLLDGTALRLKTKTWGQYWQV
YMDGIMSQVITDQVPFSVYLEPGPVITAILTVILGVLVLPDVFIRCV

Figura 2: respuesta LTC de ratones HHD tras la inmunización con el vector
TRIP-mel-IRES-GFP

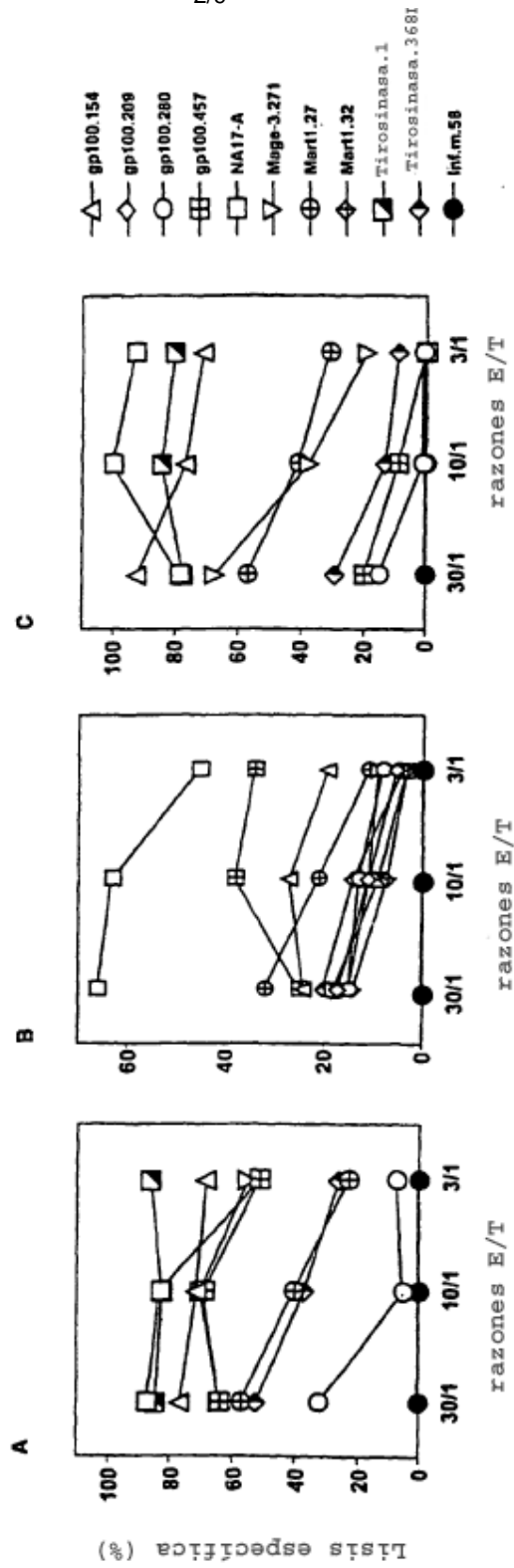


Figura 3: expresión de GFP en células dendríticas humanas tras 5 días de sus transducciones mediante los vectores derivados de VIH-1 negativos o positivos de ADN tricatenario central

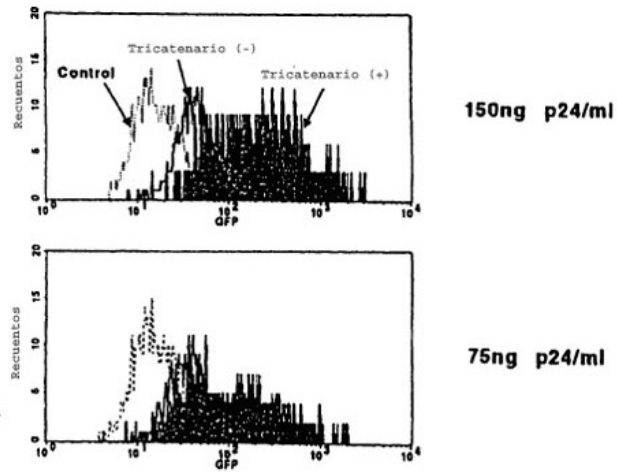
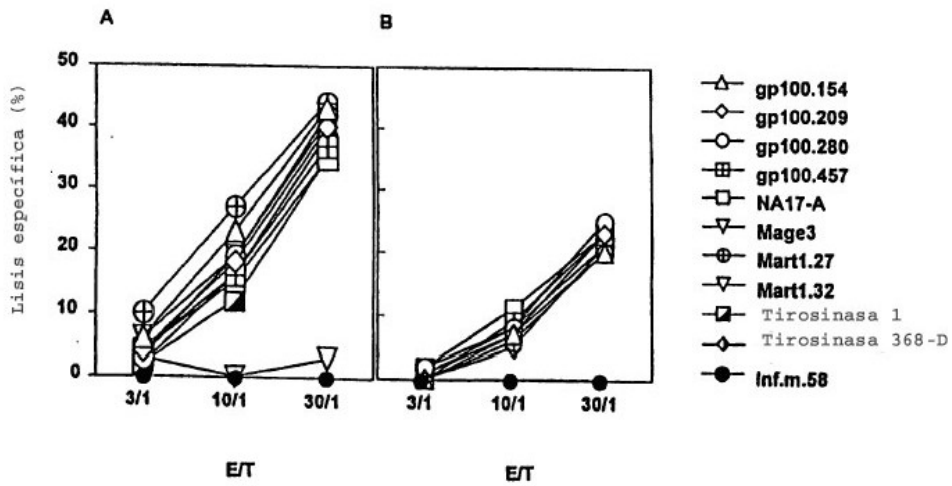


Figura 4: respuestas LTC in vitro utilizando células dendríticas humanas



Mapa de restricción del vector pHR.MEL-IRES-GFP

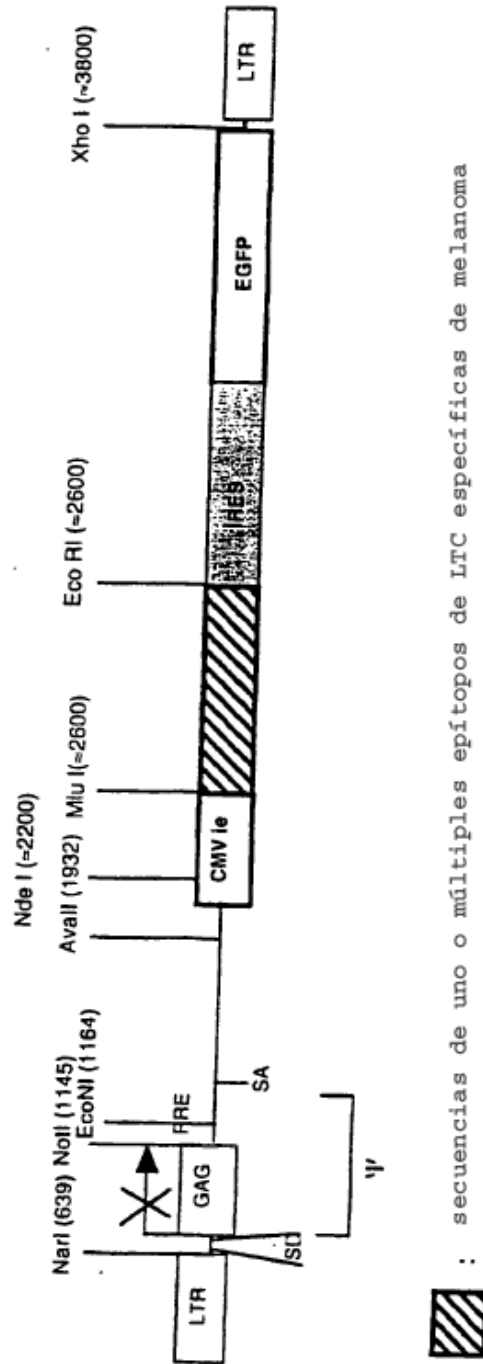


FIGURA 5

Mapa de restricción del vector pTRIP.IILKE-IRES-GFP

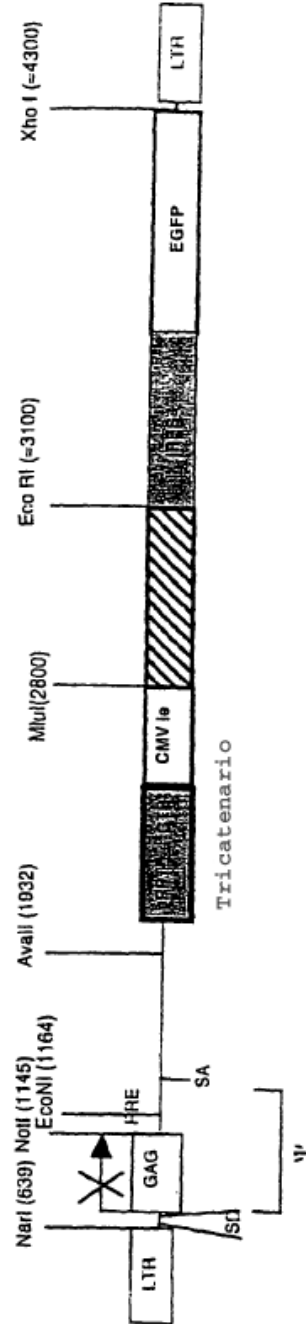


Figura 6

Mapa de restricción del vector pTRIP.TEL/AML-IRES-GFP

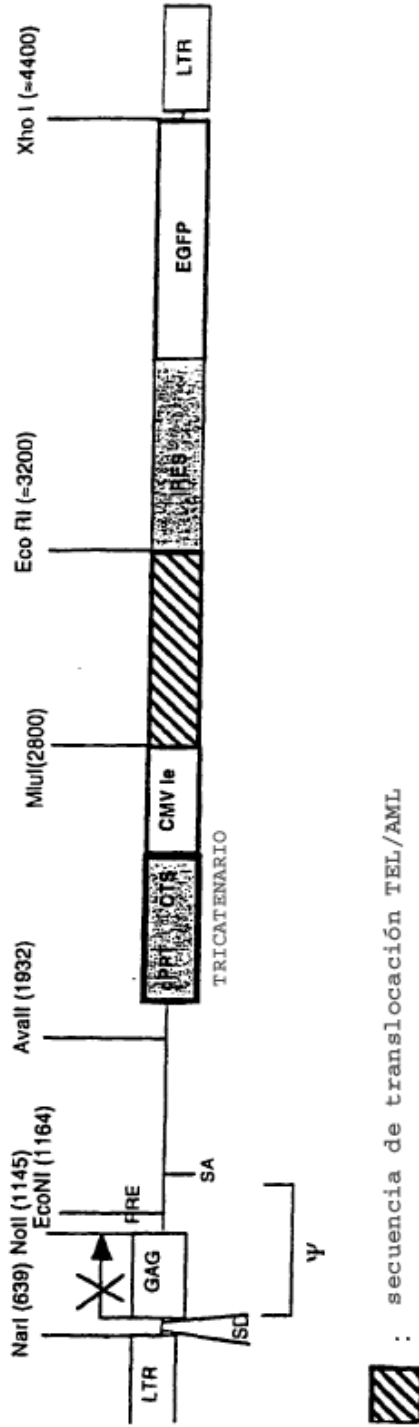


FIGURA 7

Capacidad de transducción del vector positivo tricatenario de ADN derivado de VIH que codifica para el péptido de díptopo 19V (derivado de pol VIH 1) y GFP de células dendríticas murinas que se produjeron usando células de médula ósea de ratones transgénicos HHD.

Se transdujeron aproximadamente el 80% de las células dendríticas murinas mediante el vector recombinante positivo tricatenario derivado de VIH tal como se documenta en los análisis FACS de expresión de GFP intracelular.

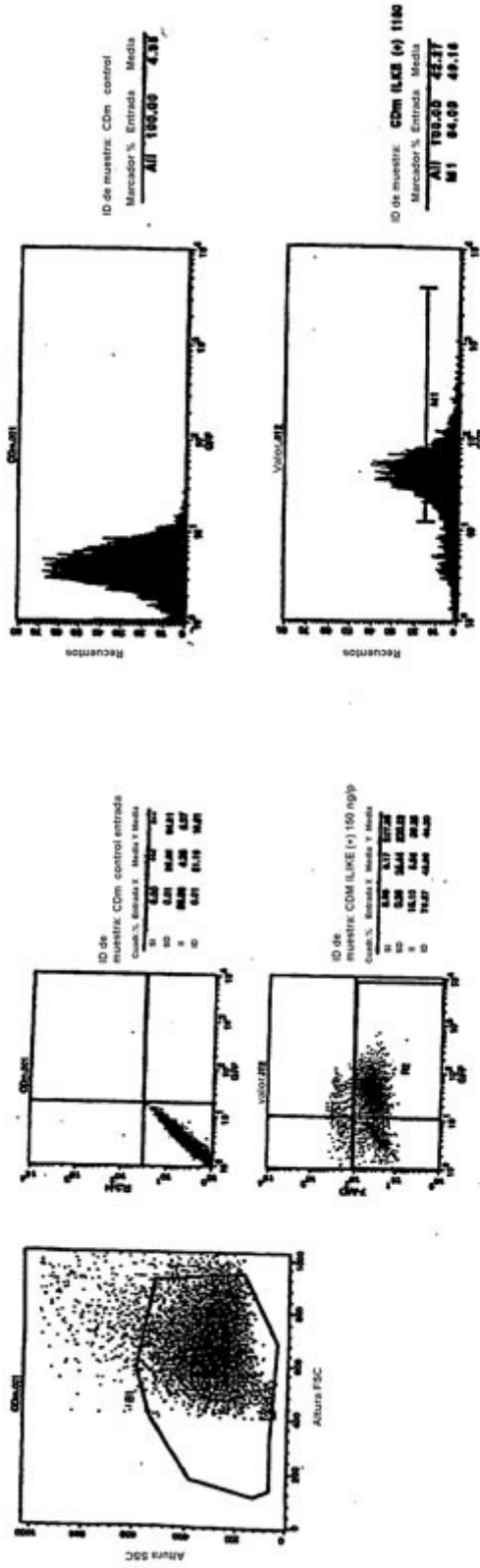


Figura 8

Figura 2: evaluación de respuestas LTCen ratones HHD tras la inmunización con el vector TRIP-des-IRES-GFP que codifica para el gen DES de Mycobacterium tuberculosis

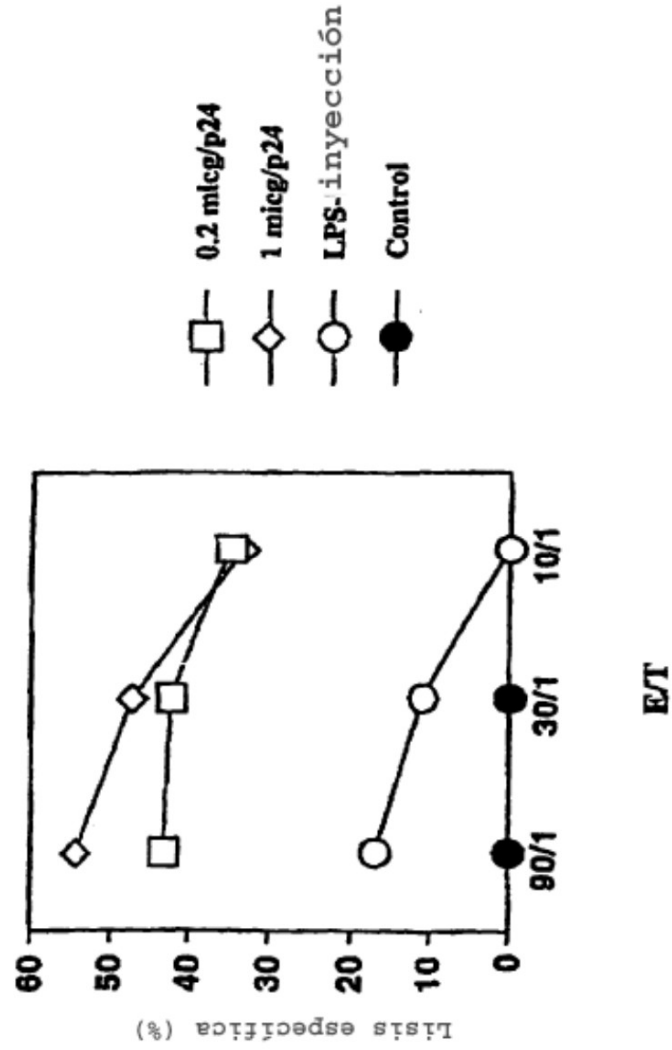


FIGURA 9

Mapa de restricción del vector pTRIP.DES-IRES-GFP

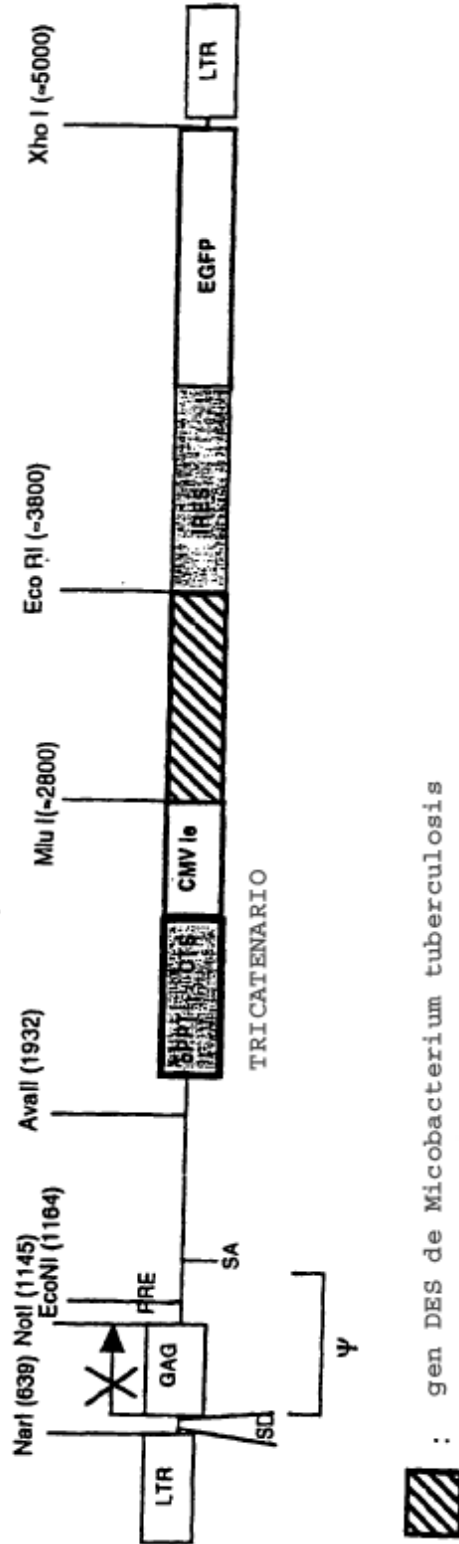


FIGURA 10