

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 498 277**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.04.2013** **E 13720364 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.06.2014** **EP 2678032**

54 Título: **Vectores lentivíricos que contienen un promotor del CMH de clase I**

30 Prioridad:

**23.05.2012 EP 12305566**

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

**24.09.2014**

73 Titular/es:

**THERAVECTYS (100.0%)  
1 mail du Professeur Georges Mathé  
94800 Villejuif, FR**

72 Inventor/es:

**SARRY, EMELINE y  
BAUCHE, CÉCILE**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 498 277 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 lentivíricos que contienen un promotor del CMH de clase I.

## CAMPO TÉCNICO

5 La presente invención está en el campo de la tecnología de vacunas recombinantes y se refiere a mejoras en los vectores lentivíricos que se pueden utilizar como vacunas terapéuticas y profilácticas. Los vectores que contienen promotores del CMH de clase I (CMHI) proporcionan unas características mejoradas con respecto a otros vectores.

## ANTECEDENTES

10 Las vacunas recombinantes se han ido desarrollando junto con el avance de la tecnología del ADN recombinante, permitiendo la modificación de genomas víricos para producir virus modificados. De esta manera, ha sido posible introducir secuencias genéticas en virus no patógenos de modo que codifican proteínas inmunógenas que se van a expresar en células diana después de la infección, con el fin de desarrollar una respuesta inmune específica en su hospedador.

15 Tales vacunas constituyen un avance importante en la tecnología de las vacunas (Kutzler et al., Nat. Rev Genet, 9(10): 776-788, 2008). En particular, en comparación con las vacunas tradicionales, tienen la ventaja de evitar los virus vivos (atenuados) y eliminar los riesgos asociados con la preparación de vacunas inactivadas.

20 La administración de genes utilizando retrovirus modificados (vectores retrovíricos) fue introducida a principios de los años 80 por Mann et al. (Cell, 33(1):153-9, 1983). Los vectores retrovíricos oncogénicos utilizados mayoritariamente se basan en el virus de la leucemia murina de Moloney (VLM). Tienen un genoma simple a partir del cual se producen las poliproteínas Gag, Pol y Env y son necesarias en *trans* para la replicación vírica (Breckpot et al., 2007, Gene Ther, 14(11):847-62; He et al. 2007, Expert Rev vaccines, 6(6):913-24). Las secuencias que se requieren en general en *cis* son las repeticiones terminales largas (LTRs) y sus inmediaciones: las repeticiones invertidas (sitios IR o att) necesarias para la integración, la secuencia de empaquetamiento  $\psi$ , el sitio de unión al ARN de transporte (sitio de unión al cebador, PBS) y algunas secuencias adicionales implicadas en la transcripción inversa (la repetición R dentro de las LTRs y los trectos de polipurina, PPT, necesarios para la iniciación de la cadena positiva). Para generar vectores retrovíricos con replicación defectuosa, los genes *gag*, *pol* y *env* se eliminan generalmente de forma completa y se reemplazan por una casete de expresión.

30 Los vectores retrovíricos que se obtienen a partir de genomas de lentivirus (es decir, vectores lentivíricos) han surgido como herramientas prometedoras tanto para la terapia génica como con fines de inmunoterapia, debido a que muestran diversas ventajas sobre otros sistemas víricos. En particular, los vectores lentivíricos ellos mismos no son tóxicos y, a diferencia de otros retrovirus, los lentivirus son capaces de transducir células que no se dividen, en particular células dendríticas (He et al. 2007, Expert Rev vaccines, 6(6):913-24), permitiendo la presentación de antígenos a través de la ruta endógena.

35 Los lentivirus están ligados a sus hospedadores por similitudes en la composición genética, mecanismos moleculares de replicación e interacciones biológicas con sus hospedadores. Se conocen mejor como agentes de síndromes de enfermedades lentas que comienzan de forma insidiosa después de períodos prolongados de infección subclínica y progresan lentamente; por lo tanto, se les conoce como los virus "lentos" (Narayan et al., 1989, J Gen Virol, 70(7):1617-39). Tienen la misma organización básica que todos los retrovirus, pero son más complejos debido a la presencia de genes accesorios (por ejemplo, *vif*, *vpr*, *vpu*, *nef*, *tat* y *rev*), que tienen un papel clave en la replicación del lentivirus *in vivo*.

40 Los lentivirus representan un género de virus lentos de la familia Retroviridae, que incluye los virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de la inmunodeficiencia del simio (VIS), el virus de la encefalitis equina infecciosa (VEEI), el virus de la artritis encefalitis caprina (VAEC), el virus de la inmunodeficiencia bovina (VIB) y el virus de la inmunodeficiencia felina (VIF). Los lentivirus pueden persistir indefinidamente en sus hospedadores y replicarse de forma continua con tasas variables durante el curso de la infección que dura toda la vida. La persistencia de la replicación de los virus en sus hospedadores depende de su capacidad para eludir las defensas del hospedador.

50 El diseño de vectores lentivíricos, recombinantes e integradores se basa en la separación de las secuencias que actúan en *cis* y en *trans* del lentivirus. Una transducción eficaz en células que no se dividen requiere la presencia de dos secuencias que actúan en *cis* en el genoma del lentivirus, el tracto central de polipurina (cPPT) y la secuencia de terminación central (CTS). Estas causan la formación de una estructura de ADN de triple cadena llamada "solapa" de ADN central, que maximiza la eficacia de la importación de genes a los núcleos de células que no se dividen, incluyendo las células dendríticas (CDs) (Zennou et al., 2000, Cell, 101(2) 173-85; Arhel et al., 2007, EMBO J, 26(12):3025-37).

55 Las células dendríticas tienen una importancia primordial para la presentación de antígenos debido a que constituyen la clase principal de células presentadoras de antígeno (APCs) cuya función principal es la de presentar antígenos e iniciar una respuesta inmune.

Para generar una respuesta inmune, las proteínas antigénicas se tienen que procesar en las células en péptidos, que se presentan en la superficie celular a través de proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). Las APCs circulantes presentan los complejos de péptido-CMH a linfocitos T en los ganglios linfáticos de drenaje, en donde interaccionan con receptores de linfocitos T y, junto con las señales coestimuladoras, activan los linfocitos T.

5 Una variedad de estudios han mostrado que la inoculación con vectores lentivíricos conduce a la presentación de antígenos en las CDs y a una fuerte activación de los linfocitos T citotóxicos específicos de antígeno (LTCs; linfocitos T CD8<sup>+</sup>). Por lo tanto, en los últimos 10 años los vectores lentivíricos se han modificado genéticamente para la transferencia de genes y aplicaciones en inmunoterapia.

10 Se ha mejorado la seguridad de los vectores lentivíricos mediante la eliminación de la secuencia U3 de LTR, dando como resultado vectores con "autoinactivación" que están totalmente desprovistos de secuencias víricas de promotor y de potenciador presentes originalmente dentro de las LTRs.

Las partículas lentivíricas que contienen vectores lentivíricos, se pueden producir por tecnología recombinante después de una transfección temporal de células humanas HEK 293T cultivadas, a través de diferentes plásmidos de ADN:

15 (i) un plásmido de empaquetamiento que expresa al menos las proteínas Gag, Pol, Rev, Tat y, en algunos casos, proteínas estructurales y enzimáticas necesarias para el empaquetamiento de la estructura artificial de transferencia;

(ii) un plásmido de transferencia, que contiene una casete de expresión y factores de VIH que actúan en *cis* necesarios para el empaquetamiento, la transcripción inversa y la integración; y

20 (iii) un plásmido que codifica la envuelta, en la mayoría de los casos la glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular (VSV.G), una proteína que permite la formación de partículas mixtas (seudotipos) que se pueden dirigir a una amplia variedad de células, especialmente las células presentadoras de antígeno (APCs) del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), incluyendo las CDs.

25 Este procedimiento permite obtener una producción temporal de vectores de partículas lentivíricas a través de las células transfectadas. Sin embargo, los vectores de partículas lentivíricas también se pueden producir de forma continua en las células, insertando de forma estable en el genoma celular los genes de empaquetamiento, el ADN que codifica el provirus y el gen de la envuelta. Esto permite la producción continua de vectores de partículas lentivíricas en las células sin tener la necesidad de una transfección temporal. Por supuesto, se puede utilizar una combinación de estos procedimientos, estando integrados algunos de los ADNs/plásmidos en el genoma celular y otros proporcionados por una transfección temporal.

30 Vectores lentivíricos que no se insertan o no integrativos se están diseñando para mitigar los riesgos de una potencial oncogénesis, ligada a eventos de mutagénesis por inserción, en particular para fines de vacunación:

35 En la vacunación basada en una inyección directa de vectores lentivíricos integrativos que codifican un antígeno, las células transducidas que expresan el antígeno relevante se convierten en dianas de la respuesta inmune provocada y se eliminan al cabo de unos pocos días o semanas del organismo vacunado.

40 Además, la delección en la región U3 de la LTR 3', de las secuencias víricas del promotor y potenciador en vectores lentivíricos con autoinactivación, limita la probabilidad de una activación de promotores endógenos. Esta delección se aplica directamente a la experiencia adquirida a partir del ensayo de terapia génica con SCID-X1, llevado a cabo en 1998-1999, realizado con vectores retrovíricos basados en el virus de Moloney, en niños que padecían una forma rara de enfermedad por inmunodeficiencia grave ligada al cromosoma X (gen SCID-X1) (Cavazzana-Calvo et al., 2000, Science, 288(5466):669-72). Durante este ensayo, cuatro de los nueve niños desarrollaron leucemia como resultado de la integración del vector retrovírico obtenido a partir de Moloney en las proximidades del protooncógeno humano LM02 (Hacein-Bey-Abina et al., 2008, J. Clin. Invest., 118(9):3132-3142). Se mostró que la malignidad era la consecuencia de la proximidad del promotor/potenciador de U3 vírico al protooncógeno LM02.

45 Los potenciadores son secuencias que actúan en *cis*, que pueden actuar como activadores de la transcripción a cierta distancia. Se han empleado mucho en vectores obtenidos a partir de virus, ya que parecen ser los más eficaces para obtener una expresión fuerte del transgén en una variedad de tipos de células, en particular las CDs (Chinnasamy, Chinnasamy et al., 2000, Hum Gene Ther 11(13):1901-9; Rouas et al., 2008, Cancer Gene Ther 9(9):715-24; Kimura et al., 2007, Mol Ther 15(7):1390-9; Gruh et al., 2008, J Gene Med 10(1) 21-32). Sin embargo, dado el problema de seguridad de la mutagénesis por inserción, tales secuencias potenciadoras de la transcripción se deben delecionar de las estructuras artificiales de vectores lentivíricos para eliminar el riesgo de mutagénesis por inserción, debida a un efecto de proximidad del potenciador. Este efecto de proximidad del potenciador es con mucho el mecanismo más frecuente de mutagénesis por inserción y es el único efecto descrito en casos en humanos o animales, de eventos tumorigénicos después de la transferencia de genes.

55 Por lo tanto, existe una necesidad de desarrollar vectores retrovíricos, en particular vectores lentivíricos que no incluyan potenciadores víricos y que permitan una expresión suficiente de los transgenes que codifican péptidos in-

munógenos, si es posible, con la misma expresión que la que se observa cuando se utiliza el promotor CMV.

Un estudio reciente ha informado sobre la sustitución de promotores víricos por promotores específicos de CDs, obtenidos a partir de genes del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (CMH de clase II) (Kimura et al., 2007, Mol Ther 15(7):1390-9) y genes dectina-2 (Lopes et al., 2008, J. Virol 82(1):86-95). El promotor del gen dectina-2 utilizado por Lopes et al. contiene un potenciador putativo y una secuencia adenovírica conservada (repeticiones terminales invertidas en el promotor de adenovirus) (Bonkabara et al., 2001, J. Immunology, 167:6893-6900). El promotor del gen del CMH de clase II utilizado por Kimura et al. no contiene ningún potenciador conocido.

Sin embargo, sin potenciador, se observó que el promotor del CMH de clase II no proporcionaba suficiente expresión del transgén en las CDs. En particular, los vectores lentivíricos que incluían promotores del CMH de clase II no provocaron una reacción inmune en ratones C57BL/6 inmunocompetentes, en contraste con las respuestas inmunes observadas con promotores/potenciadores CMV. Aunque se observó una integración y una expresión constante del transgén después de la inyección en ratones, los vectores lentivíricos transcritos a través de promotores del CMH de clase II no lograron estimular una respuesta de los linfocitos T citotóxicos CD8+ específica del antígeno, incluso después de un refuerzo por vacunación. Los autores de estos estudios, llegaron por tanto a la conclusión de que el uso de promotores del CMH de clase II era de interés solo para aplicaciones en las que se buscaba la persistencia de la expresión como en la terapia de reemplazo de genes, pero no en el contexto de la inmunoterapia.

Por lo tanto, el promotor del CMH de clase II no es un promotor adecuado en vectores lentivíricos para la inducción de una respuesta inmune contra un antígeno. Por otra parte, el promotor de dectina-2 es específico de las células dendríticas, lo que no permite la eliminación de vectores que están integrados en otros tipos de células que no expresan. Además, el promotor dectina-2 parece contener un potenciador. Por lo tanto, el promotor dectina-2 no es un buen promotor para los vectores lentivíricos por razones de seguridad.

Preferiblemente, en la inmunoterapia, los vectores lentivíricos proporcionan una expresión eficaz del transgén que provoca una respuesta inmune específica deseada. Esto requiere que la expresión tenga un nivel elevado en las APCs, tales como las células dendríticas.

También es preferible que las células transducidas por los vectores lentivíricos se eliminen a través de la respuesta inmune, para proporcionar un mayor grado de seguridad. Es decir, la respuesta inmune generada contra el transgén puede provocar una respuesta inmune en el hospedador que sea suficiente para eliminar las células que se han transducido con los vectores lentivíricos. La eliminación de las células transducidas elimina la persistencia del vector lentivírico en el hospedador y los posibles efectos secundarios del vector. Para que las células transducidas se eliminen, se requiere una expresión en células no dendríticas, a un nivel que permita la eliminación a través de la respuesta inmune.

Al mismo tiempo, el promotor debe aumentar la estimulación inmune a través de las células clave (es decir, las células dendríticas) que participan en la activación de los linfocitos T vírgenes y de memoria, y debe minimizar el riesgo de mutagénesis por inserción y la genotoxicidad en las células madre que dan lugar a tumores malignos. Por lo tanto, el promotor debe tener una actividad suficientemente elevada en las células dendríticas y en otras células, pero no contener un potenciador. Basándose en estos criterios, promotores víricos, tales como el promotor CMV, no son ideales debido a la presencia de potenciadores fuertes. Estos criterios se resumen del modo siguiente:

1. expresión elevada en las células presentadoras de antígenos, incluyendo las células dendríticas, para inducir respuestas inmunes máximas;
2. expresión en otros tipos de células transducidas, suficiente para una eliminación a través de la respuesta inmune inducida; y
3. falta de un elemento potenciador para evitar los efectos de la inserción.

Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de vectores mejorados. La presente invención satisface estas necesidades de la técnica.

## COMPENDIO DE LA INVENCION

La invención incluye composiciones que comprenden vectores lentivíricos y métodos de empleo de los vectores. En una realización, la invención incluye un vector lentivírico que comprende una secuencia transgénica que codifica un polipéptido inmunógeno, en donde la secuencia transgénica está bajo el control transcripcional de un promotor del CMH de clase I; en donde el vector induce una respuesta de los LTCs *in vivo* contra el polipéptido inmunógeno codificado, que es mayor que la de un vector en el que la secuencia transgénica está bajo el control transcripcional de un promotor CMV.

Preferiblemente, el promotor del CMH de clase I es un promotor HLA-A2, un promotor HLA-B7, un promotor HLA-Cw5, un promotor HLA-E o un promotor HLA-F.

En diversas realizaciones, la secuencia del promotor comprende una secuencia de polinucleótidos que comparte

más del 90%, preferiblemente más del 95%, más preferiblemente más del 99% de identidad con la secuencia del promotor de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:5.

En diversas realizaciones, el vector comprende una LTR que está delecionada para el promotor y potenciador de U3, una secuencia cPPT/CTS procedente de un lentivirus, una secuencia  $\psi$  (psi) y/o dos LTRs lentivíricas.

5 En una realización preferida, el vector lentivírico no contiene un potenciador.

El polipéptido inmunógeno codificado por el transgén comprende antígeno(s) de las proteínas Gag, Pol y/o Nef procedentes del virus VIH. El antígeno puede ser al menos un antígeno tumoral.

La invención incluye además una célula hospedadora aislada que comprende el vector lentivírico de la invención.

10 La invención incluye además métodos para producir una partícula de vector lentivírico. Tales métodos pueden comprender las etapas de transfectar una célula hospedadora adecuada con el vector lentivírico; transfectar la célula hospedadora con un vector plasmídico de empaquetamiento que contiene secuencias de ADN vírico que codifican al menos proteínas estructurales e integrasa de un retrovirus; cultivar dicha célula hospedadora transfectada con el fin de obtener una expresión y empaquetar dicho vector lentivírico en partículas de vector lentivírico; y recoger las partículas de vector lentivírico que son el resultado de la expresión y el empaquetamiento en dichas células hospedadoras cultivadas.

15 La invención incluye además partículas de vector lentivírico que comprenden el vector lentivírico de la invención. La partícula de vector lentivírico puede comprender una secuencia de polinucleótidos cPPT/CTS; una LTR que está delecionada para el promotor y el potenciador de U3; y/o una secuencia transgénica bajo el control de un promotor del CMH de clase I. Preferiblemente, la secuencia de promotor comprende una secuencia de polinucleótidos que comparte más del 90%, preferiblemente más del 95%, más preferiblemente más del 99% de identidad con la secuencia de promotor de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:5.

20 La invención incluye además composiciones que comprenden un vector lentivírico o una partícula de vector lentivírico de acuerdo con la invención para uso como un medicamento o vacuna.

25 La invención incluye además métodos para inducir una respuesta de linfocitos T que comprenden administrar a un paciente una partícula de vector lentivírico que comprende una secuencia de polinucleótidos cPPT/CTS; una LTR que está delecionada para el promotor y el potenciador de U3; y/o una secuencia transgénica bajo el control de un promotor del CMH de clase I.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

### Figura 1. Representación esquemática de los promotores del CMHI y CMHII

30 Los promotores del CMH de clase I (CMHI) muestran elementos reguladores conservados: kB (sitio de unión de NF- $\kappa$ B), ISRE (elemento de respuesta estimulado con interferón), SXY (elementos reguladores SXY), TATA (señal de la transcripción) y ATG (codón de inicio para la traducción del transgén). La familia de promotores del CMHII solo muestra los elementos reguladores SXY, TATA y ATG.

### Figura 2. Expresión de GFP dirigida por diversos promotores en dos tipos de células diferentes.

35 Construcciones de lentivectores que tienen diversos promotores ligados a un gen de la proteína verde fluorescente (GFP) se utilizaron para transducir células HEK293T y BDCM, y se evaluó la capacidad de los promotores para dirigir la expresión de GFP

### Figura 3A y B. Inducción de la expresión de GFP a través de diversos interferones

40 Se emplearon lentivectores que tenían diversos promotores para transducir células HEK293T y BDCM en presencia de diversas moléculas de interferón. A continuación, se evaluó la capacidad de los promotores para dirigir la expresión de GFP. Se muestra la IMF en células 293T (A) y BDCM (B). También se sometieron a ensayo versiones reducidas de los promotores del CMHI y  $\beta$ 2m, promotores en los que se habían eliminado las secuencias reguladoras kB e ISRE, transformándolos en promotores del tipo CMHII.

### Figura 4. Respuesta específica de T (media) en ratones C57Bl/6j

45 Ratones C57Bl/6j fueron inmunizados con  $1 \cdot 10^6$  UT de lentivectores en los que la expresión del antígeno del VIH estaba dirigida por los promotores indicados. Doce días después de la inmunización, las respuestas específicas de linfocitos T contra el antígeno de VIH se controlaron en esplenocitos de ratones mediante ELISPOT para IFN- $\gamma$ .

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

50 Con el fin de determinar si existían promotores que pudieran satisfacer los criterios de una expresión elevada en las células dendríticas para inducir respuestas inmunes máximas; una expresión en otros tipos de células transducidas

que fuera suficiente para una eliminación a través de la respuesta inmune inducida; y una falta de elemento potenciador para evitar los efectos de la inserción, se investigó la utilidad de los promotores de genes humanos en vectores lentivíricos. Se analizaron promotores humanos estudiando sus niveles de expresión en células dendríticas y en otros tejidos. Los promotores con niveles de expresión elevados, esperados en células dendríticas y una expresión media relativamente alta en todos los tejidos, fueron seleccionados mediante un análisis cuantitativo. Los promotores se seleccionaron adicionalmente en busca de una ausencia de secuencias potenciadoras.

Un grupo de promotores que cumple estos criterios es el de los promotores del CMH de clase I. Los promotores del CMH de clase I muestran una conservación de los sitios de unión de NF- $\kappa$ B, un elemento de respuesta estimulado con interferón (ISRE) y un módulo regulador SXY (SXY). La disposición de estos elementos en los promotores del CMH de clase I se representa en la Fig. 1.

Los promotores del CMH de clase II se consideran que son promotores específicos de células presentadoras de antígeno (incluyendo las células dendríticas). Como también se puede observar en la Figura 1, aunque los promotores del CMH de clase II contienen un módulo SXY, no contienen sitios de unión de NF- $\kappa$ B o un ISRE (Van den Helsen et al., 1998, Immunogenetics, 48:208-221). Por lo tanto, los promotores del CMH de clase II son muy diferentes de los promotores del CMH de clase I.

Otro promotor específico de células presentadoras de antígeno, dectina-2, contiene un elemento de respuesta estimulado con interferón (ISRE); pero no contiene un módulo SXY (Bonkabara et al., 2001, J. Immunology, 167:6893-6900).

El promotor humano  $\beta$ 2-microglobulina ( $\beta$ 2m) muestra cierta similitud con los promotores del CMH de clase I, ya que contiene un ISRE, aunque aguas arriba de un solo sitio de unión de NF- $\kappa$ B.

Las secuencias de varios promotores del CMH de clase I de mamífero (humano) se muestran a continuación:

**HLA-A2 (CMH I):**

attggggagtgcccagccttggggattccccaaactccgcagtttcttttctccctctcca  
acctatgtagggtccttcttcttgatactcacgacgcgaccagttctcactcccatt  
gggtgtcgggtttccagagaagccaatcagtgctcgtcgcgggtcgcgggttctaaagtccgc  
acgcaccaccgggactcagattctccccagacgcccagg

(SEQ ID NO: 1)

**HLA-B7 (CMH I):**

ggggaggcgcagcgttggggattccccactcccctgagtttcaacttcttctcccaacttg  
tgtcgggtccttcttccaggatactcgtgacgcgtccccacttcccactcccattgggta  
ttggatatctagagaagccaatcagcgtcgcgcgggtcccagttctaaagtccccacgca  
cccaccgggactcagag (SEQ ID NO: 2)

**HLA-Cw5 (CMH I):**

cactggggaggcgcgcggttgaggattctccactcccctcagtttcaacttcttctcccaa  
cctgcgtcgggtccttcttcttgaatactcatgacgcgtccccaaattcccactcccattg  
gggtgtcgggttctagagaagccaatcagcgtctcccagtcgggtctaaagtccccagt  
caccaccgggactcagattctccccagacgcccagg

(SEQ ID NO: 3)

**HLA-E (CMH I):**

taagaactgctgattgctgggaaactctgcagtttcccgttcctctcgtaacctgggtcat  
 gtgtccttcttctcctggatactcatgacgcagactcagttctcattcccaatgggtgctcgg  
 gtttctagagaagccaatcagcgtcgccacgactcccgactataaagtccccatccggac  
 tcaagaagttctcaggactcagagg (SEQ ID NO: 4)

**HLA-F (CMH I):**

aggccccgaggcggtgtctgggggtggaaggctcagtattgagaattccccatctcccca  
 gagtttctcttctctcccaaccggtgtcaggctccttcatcctggatactcataacgctgg  
 cccatttctcactcccattgggcgtcgctgttcttagagaagccaatcagtgtcgccgca  
 gttcccagggttctaaagtcccacgcacccccgctgggactcatatttttccagacgctggag  
 gttgggggtcatg (SEQ ID NO: 5)

5 Promotores del CMHI (HLA-A2, HLA-B7 o HLA-E) se insertaron en un vector lentivírico. Para comparar, los promotores de los genes EF1 $\alpha$  y ubiquitina (UBC) de expresión generalizada, también se insertaron en el vector lentivírico. Los promotores EF1 $\alpha$  y ubiquitina no contienen ningún potenciador identificado, y no contienen un módulo SXY, sitios de unión de NF- $\kappa$ B o un ISRE. Por el contrario, los promotores EF1 $\alpha$  y ubiquitina (UBC) contienen en su lugar sitios de unión a Sp1 y Ap1. También se generó un vector que contenía el promotor CMV. También se generaron vectores que contenían un promotor del CMHII (HLA-DR $\alpha$ ) o un promotor  $\beta$ 2m. En estos vectores, los promotores dirigen la expresión de la proteína fluorescente verde (GFP).  
 10

Para buscar una expresión específica de células dendríticas, los vectores se empaquetaron por cotransfección en células HEK 293 T con un plásmido de encapsidación y un plásmido que proporcionaba la envuelta VSV.G, esencialmente tal y como se describe en Naldini et al., 1996, Science 272:263-7. Tanto las células HEK 293 T como las BDCM (una línea celular similar a las células dendríticas) se transdujeron a continuación con partículas de los diferentes vectores. Se detectó expresión en las células HEK 293 T con todos los vectores.  
 15

Los vectores con un promotor CMV, un promotor UBC o un promotor EF1 $\alpha$  mostraron mayor expresión en las células HEK 293 T que en las células BDCM (Fig. 2). Sin embargo, los vectores con un promotor del CMHII (HLA-DR $\alpha$ ), un promotor del CMHI (HLA-A2, HLA-B7 o HLA-E), o un promotor de microglobulina  $\beta$ 2 ( $\beta$ 2m), mostraron mayor expresión en las células BDCM que en las HEK 293 T. Por lo tanto, todos estos promotores mostraban una hiperexpresión específica de células dendríticas.  
 20

También se evaluó la inducción de la expresión en presencia de diversos interferones. Los resultados se muestran en la Figura 3A y B. El promotor del CMHII no se podía inducir con interferones. Sin embargo, los promotores del CMHI eran inducibles con interferón  $\gamma$  en ambos tipos de células y con interferón  $\alpha$  en las células HEK 293 T. De forma similar a los promotores del CMHI, el promotor  $\beta$ 2m también era inducible con interferones. El truncamiento de los promotores del CMHI o  $\beta$ 2m para eliminar el ISRE y los sitios de unión de NF- $\kappa$ B (promotor-SXY-GFP), reducía la capacidad de inducción. Por lo tanto, la versión truncada de los promotores HLA-A2, HLA-B7, HLA-E y  $\beta$ 2m se comportaba como un promotor del CMHII con respecto a la capacidad de inducción.  
 25

A continuación, los ratones fueron inmunizados con lentivectores en los que la expresión del antígeno de VIH estaba dirigida por diversos promotores (víricos, ubicuos, del CMHI, del CMHII y  $\beta$ 2m). Doce días después de la inmunización, las respuestas específicas de linfocitos T fueron controladas en esplenocitos de ratones mediante ELISPOT para IFN- $\gamma$ . Como se muestra en la Figura 4, la inmunización con un lentivector con un promotor del CMHI proporcionó la respuesta específica de linfocitos T más elevada.  
 30

Como se observa en la Figura 4, la respuesta específica de T con los promotores del CMHI era mayor que con los promotores CMV, EF1 $\alpha$ , ubiquitina o del CMHII, y más de 3 veces superior que con los promotores EF1 $\alpha$  o CMV. La respuesta específica de T con el promotor  $\beta$ 2m fue similar a la de los promotores del CMHI. Estos resultados indican que el promotor del CMHI es un promotor inesperadamente superior a los promotores de EF1 $\alpha$ , ubiquitina, CMV o CMHII para el empleo en lentivectores para aumentar la respuesta específica de T *in vivo*.  
 35

La presente invención incluye vectores lentivíricos que comprenden promotores que contienen CMH de clase I (CMHI), y su uso para la inducción de respuestas inmunes en un hospedador.

40 La presente invención tiene, por lo tanto, como objeto principal un vector lentivírico que comprende una secuencia promotora procedente de un promotor de un gen del CMH de clase I que dirige la transcripción de un transgén, que codifica preferiblemente un polipéptido inmunógeno, en una célula hospedadora, preferiblemente en células dendríticas (CDs).

VECTOR LENTIVÍRICO

En el contexto de esta invención, un "vector lentivírico" significa un vector que no se replica, para la transducción de una célula hospedadora con un transgén que comprende secuencias de ARN o ADN de lentivirus que actúan en *cis*, y que requiere proteínas lentivíricas (por ejemplo, Gag, Pol y/o Env) que se proporcionan en *trans*. El vector lentivírico carece de expresión de las proteínas Gag, Pol y Env funcionales. El vector lentivírico puede estar presente en forma de una molécula de ARN o ADN, dependiendo de la etapa de producción o de desarrollo de dichos vectores retrovíricos.

El vector lentivírico puede estar en forma de una molécula de ADN recombinante, tal como un plásmido. El vector lentivírico puede estar en forma de un vector de partícula lentivírica, tal como una molécula(s) de ARN dentro de un complejo de lentivirus y otras proteínas. Típicamente, los vectores de partículas lentivíricas que se corresponden con partículas de lentivirus modificadas o recombinantes, comprenden un genoma que está compuesto por dos copias de ARN monocatenario. Estas secuencias de ARN se pueden obtener mediante la transcripción de una secuencia de ADN bicatenario, insertada en el genoma de una célula hospedadora (ADN de vector provírico) o se pueden obtener a partir de la expresión temporal del ADN plasmídico (ADN de vector plasmídico) en una célula hospedadora transformada.

Los vectores lentivíricos se obtienen a partir de lentivirus, en particular, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1 o VIH-2), el virus de la inmunodeficiencia de simio (VIS), el virus de la encefalitis equina infecciosa (VEEI), el virus de la artritis encefalitis caprina (VAEC), el virus de la inmunodeficiencia bovina (VIB) y el virus de la inmunodeficiencia felina (VIF), que se modifican para eliminar los determinantes genéticos implicados en la patogenicidad y se introducen nuevos determinantes útiles para obtener efectos terapéuticos.

Tales vectores se basan en la separación de las secuencias que actúan en *cis* y en *trans*. Con el fin de generar vectores con replicación defectuosa, las secuencias que actúan en *trans* (p. ej., los genes *gag*, *pol*, *tat*, *rev* y *env*) se pueden eliminar y reemplazar por una casete de expresión que codifica un transgén.

La integración y la replicación eficaces en células que no se dividen, generalmente requiere la presencia de dos secuencias que actúan en *cis* en el centro del genoma lentivírico, el tracto central de polipurina (cPPT) y la secuencia de terminación central (CTS). Estas conducen a la formación de una estructura de ADN de triple cadena denominada "solapa" (del inglés "flap") de ADN central, que actúa como una señal para eliminar la cápsida del complejo de preintegración en el poro nuclear y la importación eficaz de la casete de expresión en el núcleo de células que no se dividen, tales como las células dendríticas.

En una realización, la invención incluye un vector lentivírico que comprende un tracto de polipurina central y una secuencia de terminación central denominada secuencia cPPT/CTS tal y como se ha descrito, en particular, en el documento de solicitud de patente europea EP 2 169 073.

Otras secuencias están presentes por lo general en *cis*, tales como las repeticiones terminales largas (LTRs) que están implicadas en la integración de la secuencia de ADN del vector provírico en el genoma de una célula hospedadora. Los vectores se pueden obtener mediante la mutación de las secuencias LTRs, por ejemplo, en el dominio U3 de dicha LTR ( $\Delta$ U3) (Miyoshi H et al., 1998, J. Virol. 72(10):8150-7; Zufferey et al., 1998, J. Virol 72(12):9873-80) como se muestra en la figura 1.

Preferiblemente, el vector no contiene un potenciador. En una realización, la invención incluye un vector lentivírico que comprende secuencias de LTRs, preferiblemente con una región U3 mutada ( $\Delta$ U3) en donde se eliminan las secuencias promotoras y potenciadoras en la LTR3'.

La secuencia de empaquetamiento  $\Psi$  ( $\psi$ ) también se puede incorporar para ayudar en la encapsidación de la secuencia de polinucleótidos dentro de las partículas del vector (Kessler et al., 2007, Leukemia, 21(9): 1859-74; Paschen et al., 2004, Cancer Immunol Immunother 12(6):196-203).

En una realización, la invención incluye un vector lentivírico que comprende una secuencia de empaquetamiento de lentivirus  $\Psi$  ( $\psi$ ).

Otras secuencias funcionales adicionales, tales como un sitio de unión a ARN de transporte o un sitio de unión a cebador (PBS) o un elemento regulador postranscripcional de marmota (WPRE), también se pueden incluir ventajosamente en la secuencia de polinucleótidos del vector lentivírico de la presente invención, para obtener una expresión más estable del transgén *in vivo*.

En una realización, la invención incluye un vector lentivírico que comprende un PBS. En una realización, la invención incluye un vector lentivírico que comprende un WPRE y/o un IRES.

Por lo tanto, en una realización preferida, el vector lentivírico que comprende al menos una secuencia cPPT/CTS, una secuencia  $\Psi$ , una (preferiblemente 2) secuencia LTR y una casete de expresión que incluye un transgén bajo el control transcripcional de un promotor del CMH de clase I.

En diversas realizaciones, el vector lentivírico comprende un promotor del CMH de clase I. Preferiblemente, el promotor del CMH de clase I es un promotor HLA-A2, un promotor HLA-B7, un promotor HLA-Cw5, un promotor HLA-F o un promotor HLA-E. En diversas realizaciones, la secuencia del promotor del CMH de clase I comprende una secuencia de polinucleótidos que comparte más del 90%, preferiblemente más del 95%, más preferiblemente más del 99% de identidad con la secuencia promotora de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:5

En diversas realizaciones, el vector lentivírico que comprende un promotor del CMH de clase I induce una mayor respuesta de los LTCs *in vivo* contra el polipéptido inmunógeno codificado, que un vector en el que la secuencia del transgén está bajo el control transcripcional de un promotor CMV.

En diversas realizaciones, el vector lentivírico que comprende un promotor del CMH de clase I induce una mayor respuesta de los LTCs *in vivo* contra el polipéptido inmunógeno codificado que un vector en el que la secuencia del transgén está bajo el control transcripcional de un promotor EF1 $\alpha$ . Preferiblemente, la respuesta de los LTCs con el promotor del CMHI es al menos 2 veces o 3 veces mayor que con el promotor EF1 $\alpha$ . Dentro del contexto de esta invención, el que un vector "induzca una respuesta mayor de los LTCs *in vivo* contra el polipéptido inmunógeno codificado que un vector en el que la secuencia del transgén está bajo el control transcripcional de un promotor EF1 $\alpha$ " se puede determinar usando el ensayo expuesto en el Ejemplo 3. Otros ensayos que proporcionan resultados similares también se pueden utilizar.

En diversas realizaciones, el vector lentivírico que comprende un promotor del CMH de clase I induce una mayor respuesta de los LTCs *in vivo* contra el polipéptido inmunógeno codificado que un vector en el que la secuencia del transgén está bajo el control transcripcional de un promotor de ubicuitina. Dentro del contexto de esta invención, el que un vector "induzca una mayor respuesta de los LTCs *in vivo* contra el polipéptido inmunógeno codificado que un vector en el que la secuencia del transgén está bajo el control transcripcional de un promotor ubicuitina" se puede determinar usando el ensayo expuesto en Ejemplo 3. Otros ensayos que proporcionan resultados similares también se pueden utilizar.

## TRANSGÉN

Dentro del contexto de esta invención, un "transgén" es una secuencia de ácido nucleico dentro de un vector lentivírico que no está presente normalmente en una célula que se va a transducir con el vector lentivírico. El vector lentivírico sirve para introducir esta secuencia en la célula transducida. El término "transgén" no incluye las secuencias del vector que facilitan la transducción del transgén. El transgén puede ser una secuencia de ácido nucleico procedente de otro organismo. Alternativamente, el transgén puede ser una secuencia de ácido nucleico del mismo organismo, pero que tiene secuencias reguladoras diferentes que controlan su expresión. El transgén puede ser una molécula de ácido nucleico codificante o no codificante. De acuerdo con una realización preferida de la invención, la secuencia del transgén codifica un polipéptido inmunógeno.

Preferiblemente, el polipéptido inmunógeno es vírico, bacteriano o micótico. En una realización, el polipéptido inmunógeno es un antígeno tumoral. En una realización, el polipéptido inmunógeno es un alérgeno.

Este polipéptido inmunógeno comprende preferiblemente uno o varios epítopos procedentes de agentes de enfermedades infecciosas, por ejemplo, antígeno(s) procedentes de las proteínas Gag, Pol y/o Nef del VIH.

Varios epítopos que forman un poliepítipo también pueden estar codificados por el transgén de la invención.

En una realización particular, un epítipo de este tipo se obtiene a partir de antígenos diana identificados en tumores, y se puede elegir de tal manera que se obtenga una respuesta inmune mediada por células contra él. Los antígenos diana están bien documentados en la técnica, los cuales se pueden seleccionar en relación con varios tipos de tumores y en particular en melanomas o en carcinomas, incluyendo carcinomas renales, carcinomas de vejiga, carcinomas de colon, carcinomas de pulmón, cánceres de mama, leucemias, mielomas y linfomas.

## PROMOTORES DEL CMHI

La invención incluye la inserción de un promotor del CMH de clase I (CMHI) en un vector lentivírico. Tal y como se emplea en esta memoria, "un promotor del CMH de clase I (CMHI)" incluye un promotor del CMH de clase I de origen natural o sintético. La expresión "promotor del CMH de clase I" no incluye un promotor  $\beta$ 2m.

### **Promotores del CMHI presentes en la naturaleza**

Ejemplos de promotores del CMHI presentes en la naturaleza son los promotores de genes del HLA-A2, HLA-B7, HLA-Cw5, HLA-E, HLA-F. Estos promotores del CMHI presentes en la naturaleza generalmente se clonan o se reproducen a partir de la región promotora de un gen que codifica la proteína del CMH de clase I, o son conocidos como los que supuestamente codifican tales proteínas en bases de datos del genoma (por ejemplo: la base de datos de polinucleótidos del NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/dna-rna>). Tanto las proteínas  $\beta$ 2m como las del CMH de clase I forman parte del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH).

Las proteínas codificadas por estos genes se encuentran en casi todos los tipos de células. Las proteínas del CMH I están presentes generalmente en la superficie de la membrana de los leucocitos, en donde se asocian con la  $\beta$ 2-microglobulina ( $\beta$ 2m). El papel de estas proteínas asociadas es presentar péptidos procedentes de fuentes endógenas a los linfocitos T CD8+. Por lo tanto, desempeñan un papel central en la generación de una respuesta inmune específica de antígeno. Debido a que las proteínas del CMH de clase I han sido ampliamente estudiadas y descritas durante muchos años, sus genes están bien caracterizados y se pueden detectar usando herramientas de comparación de secuencias, tales como el método BLAST (Altschul, S.F. et al. (1990). Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215(3):403-410).

Los promotores del CMH de clase I comparten la capacidad de estar fuertemente activados en las células presentadoras de antígenos, incluyendo las células dendríticas, así como en menor grado, en la mayoría de los otros tejidos del cuerpo humano.

Los promotores del CMH de clase I de la invención pueden contener otros elementos reguladores, tales como uno o varios sitios de unión a Sp1 y ETs. En una realización preferida, el promotor del CMH de clase I contiene 2 sitios de unión a Sp1 y 1 sitio de unión a Ets. En otras realizaciones, los sitios Ap1 y/o Ap2 están contenidos adicionalmente en el promotor del CMH de clase I.

Los promotores preferidos son promotores HLA-A2, HLA-B7, HLA-Cw5, HLA-E y HLA-F humanos.

#### **Promotores del CMH de clase I sintéticos**

Los promotores del CMH de clase I también pueden ser sintéticos. Los promotores del CMH de clase I sintéticos incluyen promotores que se sintetizan usando técnicas de biología molecular para ensamblar los componentes individuales de un promotor del CMH de clase I o que se obtienen a partir de un promotor del CMH de clase I presente en la naturaleza, usando técnicas de biología molecular.

En diversas realizaciones, el promotor sintético del CMH de clase I comprende una secuencia de polinucleótidos que comparte más del 90%, preferiblemente más del 95%, más preferiblemente más del 99% de identidad con la secuencia promotora de un promotor de un gen del CMH de clase I (SEQ ID NOs: 1-5).

#### **ISRE**

La transcripción de los genes de una clase del CMH suele estar mediada por dos elementos reguladores principales: el elemento de respuesta estimulado por interferón (ISRE) y el módulo SXY (que incluye los elementos reguladores W/S, X1X2/Sitio  $\alpha$  e Y/potenciador B) (véase la figura 1). Véase también Van den Elsen, Immunogenetics (1998) 48:208-211.

Estos elementos promotores reguladores se localizan en una región que se extiende aproximadamente entre los nucleótidos -220 a -95 aguas arriba del sitio de iniciación de la transcripción. Median en la transcripción específica del tejido e inducida por citocinas de los genes del CMH de clase I.

El ISRE de los promotores de genes del CMH de clase I contiene por lo general sitios de unión para miembros de la familia del factor regulador del interferón (IRF). Por tanto, es una propiedad de los promotores del CMH de clase I el unirse a miembros de la familia del factor regulador del interferón (IRF). Esto se puede verificar, por ejemplo, mediante ensayos de cambios en gel.

#### **Sitio de unión a NF- $\kappa$ B**

Otro elemento regulador, el potenciador A (que contiene sitios de unión para el factor de transcripción nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)) está presente en la mayoría de los casos. Por lo tanto, es una propiedad de los promotores del CMH de clase I unirse al factor de transcripción nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). Esto se puede verificar, por ejemplo, mediante ensayos de cambios en gel.

#### **Módulo SXY**

Además del ISRE, los promotores del CMH de clase I comparten en general otro grupo de motivos de secuencias conservadas aguas arriba, que consisten en tres elementos reguladores: la caja S o W, las cajas X1/CREX2 o el sitio  $\alpha$ , y la caja Y o el potenciador B, los cuales todos juntos se denominan el módulo SXY. Este módulo SXY está unido generalmente de forma cooperativa a un complejo multiproteico que contiene el factor regulador X (RFX; que consiste en RFX5, RFXB/ANK y RFXAP), la proteína que se une a un elemento de respuesta a AMPc (CREB)/factor activador de la transcripción (ATF), y el factor nuclear Y (NFY), que actúa como un potenciosoma (del inglés "enhanceosome") dirigiendo la transactivación de estos genes. Por lo tanto, es una propiedad de los promotores del CMH de clase I unirse a estos factores. Esto se puede verificar, por ejemplo, mediante ensayos de cambios en gel.

En contraste, los promotores del CMH de clase II no presentan un potenciador A ni elementos ISRE (Van den Elsen, P.J. et al., 1998, Immunogenetics. 48:208-221). Además se ha descubierto que RFX y CIITA en la regulación de los genes del CMH de clase II, tienen una importancia fundamental tal y como se ha ilustrado en estudios con líneas celulares establecidas a partir de pacientes con el síndrome del linfocito desnudo (BLS), una inmunodeficiencia combi-

nada grave debida a mutaciones en una de las subunidades de RFX o CIITA (DeSandro, A. et al., 1999, Am J Hum Genet, 65:279-286). También, la falta de CIITA o de una de las subunidades de RFX afecta al funcionamiento y a la ensambladura del potociosoma del CMH, respectivamente, lo que conduce a una falta de transcripción del CMH de clase II y a una reducción de los niveles de transcripción del CMH de clase I (Van den Elsen, P.J. et al. 2004, Current Opinion in Immunology, 16:67-75).

En una realización, la invención incluye un método que comprende la inserción de un promotor del CMH de clase I en un vector lentivírico para dirigir la expresión de un transgén que codifica preferiblemente un polipéptido inmunógeno, que codifica lo más preferiblemente un antígeno microbiano o una proteína terapéutica. El método puede comprender además la inserción de cualquiera de los otros elementos de ácido nucleico mencionados en este documento, tales como una secuencia solapa de ADN.

#### PRODUCCIÓN DE VECTORES DE PARTÍCULAS LENTIVÍRICAS

La presente invención proporciona un método para producir un vector de partícula lentivírica, que preferiblemente no comprende secuencias potenciadoras, pero en su lugar contiene un promotor del CMH de clase I. Un vector de partícula lentivírica (o partícula de vector lentivírico) comprende un vector lentivírico asociado con proteínas víricas. El vector puede ser integrador o no integrador.

La sustitución de las secuencias potenciadoras víricas utilizadas en los vectores de la técnica anterior, para dirigir la expresión del gen con un promotor del CMH de clase I, puede mejorar la seguridad de los vectores retrovíricos:

1) Se reduce el riesgo de mutagénesis por inserción ligada a secuencias de potenciador; y

2) los promotores del CMH de clase I se activan en la mayoría de los tipos de células humanas, si no en todas ellas, de manera que una vez que se provoca la respuesta inmune contra el producto del transgén, todas las células en las que se ha integrado el vector, del tipo celular que sea, son eliminadas por el sistema inmune. Por lo tanto, después de un período de tiempo, el cuerpo humano no puede contener ninguna replicación de dicho vector.

De acuerdo con una realización de este método, el vector de la partícula se obtiene en una célula hospedadora transformada con un plásmido de ADN.

Un plásmido de ADN de este tipo puede comprender:

- un origen de replicación bacteriano (p. ej.: ori de pUC);
- un gen de resistencia a antibióticos (p. ej.: KanR) para la selección; y más particularmente:
- un vector lentivírico que comprende al menos un transgén ligado en la transcripción a un promotor del CMH de clase I.

Un método de este tipo permite producir una partícula de vector recombinante de acuerdo con la invención, que comprende las siguientes etapas:

i) transfectar una célula hospedadora adecuada con un vector lentivírico;

ii) transfectar dicha célula hospedadora con un vector plasmídico de empaquetamiento, que contiene secuencias de ADN vírico que codifican por lo menos actividades estructurales y de polimerasa (+/- integrasa) de un retrovirus (preferiblemente lentivirus); tales plásmidos de empaquetamiento se han descrito en la técnica (Dull et al., 1998, J Virol, 72(11):8463-71; Zufferey et al., 1998, J Virol 72(12):9873-80).

iii) cultivar dicha célula hospedadora transfectada con el fin de obtener una expresión y empaquetar dicho vector lentivírico en partículas de vector lentivírico; y

iv) recoger las partículas de vector lentivírico que resultan de la expresión y el empaquetamiento de la etapa iii) en dichas células hospedadoras cultivadas.

Por diferentes razones, puede ser útil seudotipificar las partículas retrovíricas obtenidas, es decir, añadir o sustituir proteínas específicas de la envuelta de la partícula. Por ejemplo, puede ser ventajoso tener diferentes proteínas de la envuelta con el fin de distinguir la partícula recombinante de las partículas naturales o de otras partículas recombinantes. En cuestión de estrategia de vacunación, los vectores de partículas seudotipificados son más propensos a escapar del sistema inmune, cuando este último ya ha desarrollado inmunidad contra los lentivirus. Esto es particularmente útil cuando se requieren inyecciones sucesivas de vectores de partículas similares para inmunizar a un paciente contra una enfermedad.

Con el fin de seudotipificar las partículas retrovíricas de la invención, la célula hospedadora se puede transfectar además con uno o varios plásmidos de ADN de la envuelta que codifican proteína(s) de la envuelta vírica, preferiblemente una proteína de la envuelta VSV-G.

Una célula hospedadora apropiada es preferiblemente una línea celular humana cultivada como, por ejemplo, una línea celular HEK.

5 Alternativamente, el método para producir la partícula de vector se lleva a cabo en una célula hospedadora, cuyo genoma se ha transformado de manera estable con uno o varios de los siguientes componentes: una secuencia de ADN de vector lentivírico, los genes de empaquetamiento y el gen de la envuelta. Una secuencia de ADN de este tipo se puede considerar similar a un vector provírico de acuerdo con la invención, que comprende un promotor adicional para permitir la transcripción de la secuencia del vector y mejorar la tasa de producción de partículas.

10 En una realización preferida, la célula hospedadora se modifica adicionalmente para ser capaz de producir partículas víricas en un medio de cultivo, de manera continua, sin que las células completas se hinchen o mueran. Se puede hacer referencia a Strang et al., 2005, J. Virol 79(3):1165-71; Relander et al., 2005, Mol Ther 11(3):452-9; Stewart et al., 2009, Gene Ther, 16(6):805-14; y Stuart et al., 2011, Hum gene Ther (en prensa), con respecto a tales técnicas para la producción de partículas víricas.

Un objeto de la presente invención consiste en una célula hospedadora transformada con un vector de partícula lentivírica.

15 Los vectores de partículas lentivíricas pueden comprender los siguientes elementos, según lo definido anteriormente:

- secuencia de polinucleótidos cPPT/CTS; y
- una secuencia transgénica bajo el control de un promotor del CMH de clase I, y opcionalmente uno de los elementos adicionales descritos anteriormente.

## 20 MÉTODOS PARA EXPRESAR UN TRANSGÉN EN UNA CÉLULA

La presente invención incluye métodos para la expresión de un transgén en una célula, preferiblemente una célula que no se divide. El método comprende transducir una célula con un vector lentivírico o un vector de partícula lentivírica de la invención en condiciones que permiten la expresión del transgén.

25 Las células son preferiblemente células de mamífero, particularmente células humanas. Se prefieren particularmente las células humanas que no se dividen.

El transgén codifica preferiblemente un polipéptido inmunógeno. El método puede comprender además la recogida o el aislamiento del polipéptido.

El vector lentivírico o preferiblemente el vector de partícula lentivírica comprende un promotor del CMH de clase I.

30 En una realización, la invención incluye un método para expresar un transgén que comprende la inserción de un promotor del CMH de clase I en un vector lentivírico de modo que dirige la expresión de un transgén, y se transduce una célula con el vector que contiene el promotor del CMH de clase I.

## USO TERAPÉUTICO DE VECTORES LENTIVÍRICOS

35 La presente invención se refiere además al uso de los vectores lentivíricos de acuerdo con la invención, especialmente en forma de vectores de partículas lentivíricas, para la preparación de composiciones o vacunas terapéuticas que son capaces de inducir o contribuir a la aparición o la mejora de una reacción inmune contra epítopos, más particularmente aquellos codificados por el transgén presente en los vectores, bajo el control transcripcional del promotor del CMH de clase I.

Por tanto, la presente invención proporciona vectores que son útiles como un medicamento o vacuna.

40 Estos vectores se emplean preferentemente en el tratamiento o la profilaxis de enfermedades infecciosas, especialmente enfermedades asociadas con una infección vírica y más particularmente, con una infección retrovírica, tales como el SIDA y otras inmunodeficiencias.

La invención también se puede utilizar en protocolos de tratamiento contra tumores y cánceres y, especialmente, se podría utilizar en protocolos para inmunoterapia o terapia de vacunación contra tumores.

45 Como los vectores de la invención se dirigen más específicamente a las células dendríticas para obtener una respuesta inmune mediada por células y, especialmente, la respuesta de LTC asociada con el antígeno expresado por el transgén en estas células, son particularmente útiles como vacunas que se dirigen a microorganismos patógenos lentos o endógenos, tales como las micobacterias o el virus VIH.

Por consiguiente, la invención se refiere a una composición inmunógena que comprende un vector lentivírico tal como se ha definido anteriormente.

50 Las composiciones inmunógenas de la invención contienen preferiblemente secuencias cPPT y CTS en el vector y

en las partículas de vector para inducir o estimular la importación nuclear del genoma del vector en las células diana.

Durante la transcripción inversa, las secuencias cPPT y CTS inducen la formación de una estructura de ADN de tres cadenas denominada triple hélice de ADN, que estimula la importación nuclear de la secuencia del vector de ADN. Preferiblemente, el vector comprende un transgén y señales reguladoras de la retrotranscripción, expresión y encapsidación de origen retroviral o de tipo retroviral, en donde la composición es capaz de inducir o de estimular una respuesta de LTCs (linfocitos T citotóxicos) y/o una respuesta de CD4 contra uno o varios epítopos codificados por la secuencia del transgén presente en el vector.

5

La expresión del transgén se mejora en gran medida mediante la inclusión de un promotor del CMH de clase I en el vector.

10 Por lo tanto, los vectores lentivirales de acuerdo con la invención tienen la capacidad de inducir, mejorar o, en general, de estar asociados con la aparición de una respuesta de LTCs de memoria. En otras palabras, se pueden utilizar para la preparación de una composición terapéutica para el tratamiento de alergias, enfermedades autoinmunes, enfermedades tumorales o enfermedades infecciosas, mediante inducción, estimulación o participación en la aparición de una respuesta inmune mediada por células, especialmente una respuesta de LTCs o una respuesta de memoria.

15 Los vectores lentivirales de la invención se pueden utilizar en métodos de tratamiento y en métodos para inducir una respuesta inmune que comprenden administrar el vector lentiviral a un hospedador y generar una respuesta inmune específica contra el transgén en el hospedador. Las células y los anticuerpos generados en estos hospedadores se pueden utilizar como reactivos de diagnóstico.

20 Los vectores lentivirales de acuerdo con la invención se pueden administrar directamente a un paciente a través de rutas de administración conocidas, incluyendo rutas de administración sistémica, local o cutánea, intradérmica, por ejemplo, intratumoral. La administración *ex vivo*, por ejemplo, la transducción *ex vivo* de células diana seguida de una administración de las células tratadas al paciente que se va a tratar, también se incluye en la invención.

25 En una realización particular, la composición inmunógena de acuerdo con la invención se puede administrar directamente al paciente, de tal manera que induce, mejora o participa *in vivo* en la aparición de una respuesta inmune mediada por células, especialmente una respuesta inmune mediada por LTCs.

En otra realización, las composiciones inmunógenas se usan una vez o después de una administración repetida, de manera que pueden permitir la aparición de una respuesta a largo plazo mediada por células de memoria.

30 Una ventaja particular de las composiciones inmunógenas de la invención es que se pueden utilizar para provocar o estimular una respuesta inmune mediada por células contra varios epítopos codificados por la secuencia de nucleótidos de interés o el transgén presente en el vector o en las partículas del vector, y también se pueden utilizar para provocar o estimular una respuesta inmune mediada por células contra el producto de la secuencia completa de un gen, por ejemplo, un gen de un agente patógeno o fragmentos de dicho gen capaces de codificar al menos 8 a 15 aminoácidos, preferiblemente 9 a 12 aminoácidos.

35 La invención también incluye un vector lentiviral que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una repetición múltiple (al menos 2 secuencias idénticas) de dicha secuencia de aminoácidos que induce una respuesta celular, y/o una secuencia de aminoácidos que contiene al menos 2 secuencias diferentes que se corresponden a 2 epítopos de agentes patógenos o antígenos tumorales diferentes.

40 Como resultado, la invención incluye una composición que se podría utilizar en protocolos de vacunación profiláctica y/o terapéutica, para el tratamiento de tumores y especialmente como un tratamiento contra el cáncer o enfermedades infecciosas.

En particular, se puede utilizar en combinación con adyuvantes, otras composiciones inmunógenas, quimioterapia o cualquier otro tratamiento terapéutico.

45 Habiendo descrito de este modo diferentes realizaciones de la presente invención, los expertos en la técnica deben tener en cuenta que las divulgaciones del presente documento son solamente ejemplares y que se pueden realizar otras alternativas, adaptaciones y modificaciones diversas dentro del alcance de la presente invención. Por consiguiente, la presente invención no se limita a las realizaciones específicas tal y como se ilustra en el presente documento.

## EJEMPLOS

### Ejemplo 1. Expresión de GFP dirigida por diversos promotores en dos tipos de células diferentes.

50 Construcciones de lentivectores que incluían varios promotores se utilizaron para transducir células HEK293T (una línea de fibroblastos) y BDCM (una línea de células similares a las dendríticas), y la capacidad de los promotores para dirigir la expresión de GFP se evaluó por citometría de flujo. La IMF (intensidad media de la fluorescencia) en las células BDCM se representa en % de la IMF obtenida en células 293T.

Los promotores víricos (CMV) y ubicuos (UBC y EF1 $\alpha$ ) parece que están inhibidos en las BDCM, mientras que los promotores del CMH I (HLA-A2, HLA-B7 y HLA-E) y del CMH II (HLA-DR $\alpha$ ) se hiperexpresan en este tipo de células. El promotor  $\beta$ 2m también se hiperexpresaba en este tipo de células.

5 Las células se sembraron en placas de 24 pocillos con una densidad de  $1 \times 10^5$  células por pocillo en medio completo que contenía 10% de FBS. Para cada uno de los tipos de células, se transdujeron 3 pocillos con  $1 \times 10^5$  células, sustituyendo el medio de cultivo con 300  $\mu$ l de la dilución de muestras víricas lo que permitió un porcentaje de células transducidas incluido entre el 5 y 30%. Las células se incubaron a continuación 2 h a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y se añadió 1 ml de medio completo por pocillo. Después de 72 h de la transducción, las células se trataron con tripsina y se resuspendieron, y se midió la IMF de GFP con un citómetro de flujo FACSCalibur, utilizando el canal FL1.

## 10 **Ejemplo 2. Inducción de la expresión de GFP a través de diversos interferones**

Para transducir células HEK293T y BDCM se emplearon lentivirus que incluían varios promotores, en presencia de diversas moléculas de interferón. A continuación, se evaluó la capacidad de los promotores para dirigir la expresión de GFP. Versiones reducidas de promotores del CMH-1 y  $\beta$ 2m también se sometieron a ensayo, los promotores HLA-A2, HLA-B7, HLA-E y  $\beta$ 2m-SXY (promotores en los que las secuencias reguladoras kB e ISRE se habían eliminado, transformándolos en promotores del tipo CMHII).

20 Tal y como se muestra en la figura 3, el promotor del CMHII no se podía inducir con interferones, ni en las células 293 T ni las BDCM. Sin embargo, los promotores del CMHI se podían inducir con interferón  $\alpha$  en ambos tipos de células y con el interferón  $\alpha$  en las células 293 T. De forma similar a los promotores del CMHI, el promotor  $\beta$ 2m también se podía inducir con interferones. El truncamiento de los promotores del CMHI o  $\beta$ 2m para eliminar el ISRE y los sitios de unión a NF- $\kappa$ B (promotor-SXY-GFP), reducía la capacidad de inducción. Por lo tanto, la versión truncada de los promotores HLA-A2, HLA-B7, HLA-E y  $\beta$ 2m se comportaba como un promotor del CMHII con respecto a la capacidad de inducción.

25 Las células se sembraron en placas de 24 pocillos con una densidad de  $1 \times 10^5$  células por pocillo en medio completo que contenía 10% de FBS. Para cada uno de los tipos de células, se transdujeron 12 pocillos con  $1 \times 10^5$  células, sustituyendo el medio de cultivo con 300  $\mu$ l de la dilución de las muestras víricas, lo que permitió un porcentaje de células transducidas incluido entre el 5 y el 30%. Las células se incubaron después 2 h a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y se añadió 1 ml de medio completo a 3 pocillos, 1 ml de medio completo que contenía 650 U/ml (500 U finales) de IFN $\gamma$  se añadió a otros 3 pocillos, 1 ml de medio completo que contenía 650 U/mL (500 U finales) de IFN $\alpha$  se añadió a otros 3 pocillos y 1 ml de medio completo que contenía 650 U/ml (500 U finales) de IFN $\beta$  se añadió a los 3 últimos pocillos, para cada transducción de vectores. Las placas se incubaron a continuación a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. Después de 72 h de la transducción, las células se trataron con tripsina y se resuspendieron, y se midió la IMF de GFP con un citómetro de flujo FACSCalibur, utilizando el canal FL1.

## 30 **Ejemplo 3. Respuesta específica de linfocitos T (media) en ratones C57Bl/6j**

35 Ratones C57Bl/6j fueron inmunizados con  $1 \times 10^6$  UT de lentivectores en los que la expresión del antígeno del VIH estaba dirigida por diversos promotores (vírico, ubicuo, CMHI y CMHII). Doce días después de la inmunización, las respuestas específicas de linfocitos T se controlaron en esplenocitos de ratones mediante ELISPOT para IFN- $\gamma$ . Como se muestra en la figura 4, la inmunización con lentivectores que incluían un promotor del CMHI, proporcionó una respuesta específica de los linfocitos T más elevada que cualquiera de los otros lentivectores utilizados, incluso cuando un promotor vírico estaba dirigiendo la expresión del antígeno.

40 Se aislaron esplenocitos a partir de los bazos de ratones inmunizados con lentivectores, 12 días después de la inmunización y se utilizaron para los ensayos de ELISPOT. Placas de cultivo de tejidos de noventa y seis pocillos (Millipore) se recubrieron durante la noche a 4°C con 50  $\mu$ l/pocillo de 5  $\mu$ g/ml de AcMo de IFN $\gamma$  anti-ratón (pareja de Elispot de IFN $\gamma$  de ratón; BD Biosciences Pharmingen). Las placas se lavaron tres veces con 200  $\mu$ l de DPBS/pocillo y se bloquearon con 200  $\mu$ l/pocillo de DPBS/suero bovino fetal al 10% durante 2 h a 37°C. Las placas se lavaron tres veces con 200  $\mu$ l de DPBS/pocillo. Los esplenocitos se añadieron a las placas por triplicado a 2,5, 4,1 o 5,1  $\times 10^5$  células/pocillo y se estimularon con 2  $\mu$ g/ml de péptidos estimuladores (específicos del antígeno), concanavalina A (5  $\mu$ g/ml; fuente) o solo medio de cultivo. Las placas se incubaron durante 18 h a 37°C y luego se lavaron tres veces con 200  $\mu$ l/pocillo de DPBS/0,05% de Tween 20 y tres veces con 200  $\mu$ l/pocillo de DPBS. Para la detección, se añadieron 50  $\mu$ l/pocillo de 2  $\mu$ g/ml de anticuerpo monoclonal anti-ratón con IFN $\gamma$  biotinilado (BD Pharmingen) durante 2 h a temperatura ambiente. Las placas se lavaron y 100  $\mu$ l/pocillo de estreptavidina-fosfatasa alcalina (Roche) se diluyeron 1:2000 en PBS de Dulbecco durante 90 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar las placas, se visualizaron las manchas (células secretoras de IFN $\gamma$ ) mediante la adición de 60  $\mu$ l/pocillo de solución BCIP/NBT (Sigma). Las placas se incubaron durante 15-30 minutos a temperatura ambiente hasta que se desarrollaron manchas azules y después se lavaron a fondo con agua corriente del grifo y se secaron al aire durante 24 h. Por último, las manchas se contaron usando un BioReader 2000 (Biosys).

**LISTA DE SECUENCIAS**

	<110> THERAVECTYS	
	<120> VECTORES LENTIVÍRICOS QUE CONTIENEN UN PROMOTOR DEL CMH DE CLASE I	
	<130> P55163WO/SJL	
5	<150> EP12305566.7 <151> 23-05-2012  <160> 5  <170> PatentIn versión 3.5	
10	<210> 1 <211> 220 <212> ADN <213> Homo sapiens  <400> 1 attggggagt cccagccttg gggattcccc aactccgcag tttcttttct ccctctccca 60 acctatgtag ggtccttctt octggatact cacgacgcgg acccagttct cactcccatt 120 gggtgtcggg tttccagaga agccaatcag tgtcgtcgcg gtgcggttc taaagtccgc 180 acgcacccac cgggactcag attctcccca gacgccgagg 220	
15	<210> 2 <211> 197 <212> ADN <213> Homo sapiens  <400> 2 ggggaggcgc agcgttgggg attccccact cccctgagtt tcacttcttc tcccaacttg 60 tgtcgggtcc ttcttccagc atactcgtga cgcgtcccca cttcccactc ccattgggta 120 ttggatatct agagaagcca atcagcgtcg ccgcggtccc agttctaaag tccccacgca 180	
20	cccacccgga ctcagag 197  <210> 3 <211> 216 <212> ADN <213> Homo sapiens	
25	<400> 3 cactggggag gcgccgcgtt gaggattctc cactcccctc agtttcactt cttctcccaa 60 octgcgtcgg gtccttcttc ctgaatactc atgaocgctc cccaattccc actcccattg 120 gggtgtcgggt tctagagaag ccaatcagcg tctccgcagt cccggtctaa agtccccagt 180 caccaccccg gactcagatt ctccccagac gccgag 216	
30	<210> 4 <211> 205 <212> ADN <213> Homo sapiens  <400> 4 taagaactgc tgattgctgg gaaactctgc agtttcccg tccctctcgta acctgggtcat 60 gtgtccttct tcctggatac tcatgacgca gactcagttc tcattcccaa tgggtgtcgg 120 gtttctagag aagccaatca gcgtcgcacc gactcccagac tataaagtcc ccatccggac 180 tcaagaagtt ctcaggactc agagg 205	

# ES 2 498 277 T3

<210> 5  
<211> 252  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

5 <400> 5  
aggccccgag gcggtgtctg gggttggaag gctcagtatt gagaattccc catctcccca 60  
gagtttctct ttctctccca acccgtgtca ggtccttcat cctggatact cataacgcgg 120  
ccccatttct cactcccatt gggcgtcgcg tttctagaga agccaatcag tgtcgcgca 180  
gttcccaggt tctaaagtcc cacgcacccc gcgggactca tatttttccc agacgcggag 240  
gttggggtca tg 252

**REIVINDICACIONES**

1. Un vector lentivírico que comprende una secuencia transgénica que codifica un polipéptido inmunógeno, en el que la secuencia transgénica está bajo el control transcripcional de un promotor del CMH de clase I.
- 5 2. El vector lentivírico según la reivindicación 1, en el que el vector induce una mayor respuesta de los LTCs *in vivo* contra el polipéptido inmunógeno codificado que un vector en el que la secuencia transgénica está bajo el control transcripcional de un promotor CMV.
3. El vector lentivírico según la reivindicación 1 o 2, en el que el promotor del CMH de clase I es un promotor HLA-A2, un promotor HLA-B7, un promotor HLA-Cw5, un promotor HLA-F o un promotor HLA-E.
- 10 4. El vector lentivírico según la reivindicación 1 o 2, en el que dicha secuencia promotora comprende una secuencia de polinucleótidos que comparte más del 90%, preferiblemente más del 95%, más preferiblemente más del 99% de identidad con la secuencia promotora de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:5.
- 15 5. El vector lentivírico según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende una LTR que está delecionada para el promotor y potenciador de U3, una secuencia cPPT/CTS procedente de lentivirus, una secuencia  $\Psi$  (psi) o dos LTRs lentivíricas.
6. El vector lentivírico según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el vector lentivírico no contiene un potenciador.
7. El vector lentivírico según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que dicho polipéptido inmunógeno comprende uno o varios antígenos procedentes de las proteínas Gag, Pol y/o Nef del virus VIH o al menos un antígeno tumoral.
- 20 8. Una célula hospedadora aislada que comprende el vector lentivírico según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
9. Un método para producir una partícula de vector lentivírico que comprende las etapas de:
  - 25 a) transfectar una célula hospedadora adecuada con el vector lentivírico según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7;
  - b) transfectar dicha célula hospedadora con un vector plasmídico de empaquetamiento que contiene secuencias de ADN vírico que codifican por lo menos actividades estructurales y de polimerasa de un retrovirus;
  - c) cultivar dicha célula hospedadora transfectada con el fin de obtener una expresión y el empaquetamiento de dicho vector lentivírico en las partículas de vector lentivírico; y
  - 30 d) recoger las partículas de vector lentivírico que resultan de la expresión y el empaquetamiento de la etapa c) en dichas células hospedadoras cultivadas.
10. Una partícula de vector lentivírico que comprende el vector lentivírico según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
11. Una partícula de vector lentivírico que comprende al menos los siguientes elementos de secuencia:
  - 35 a) una secuencia de polinucleótido cPPT/CTS;
  - b) una LTR que está delecionada para el promotor y potenciador de U3; y
  - c) una secuencia transgénica bajo el control de un promotor del CMH de clase I.
12. La partícula de vector lentivírico según la reivindicación 11, en la que dicha secuencia de promotor comprende una secuencia de polinucleótidos que comparte más del 90%, preferiblemente más del 95%, más preferiblemente más del 99% de identidad con la secuencia de promotor de SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:5.
- 40 13. Un vector lentivírico o una partícula de vector lentivírico según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 y 11-12, para uso como medicamento o vacuna.

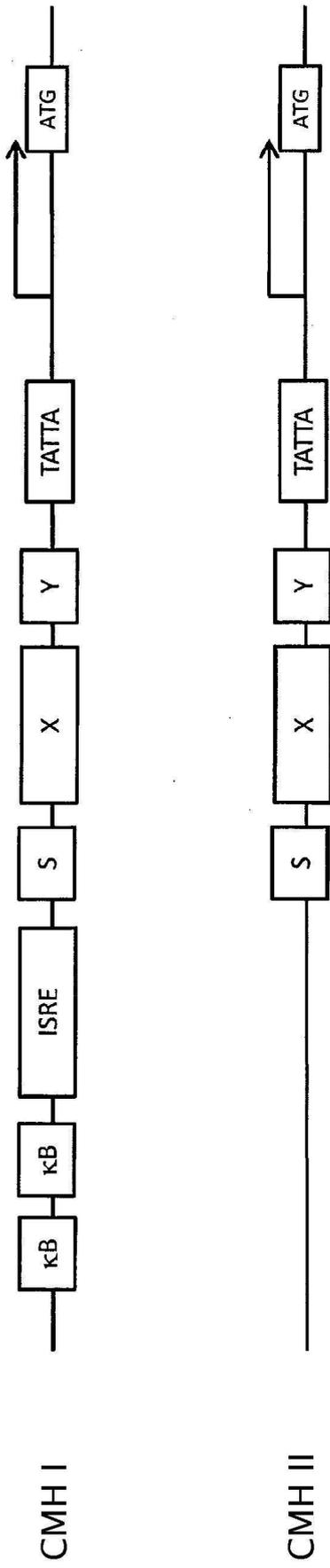


Figura 1

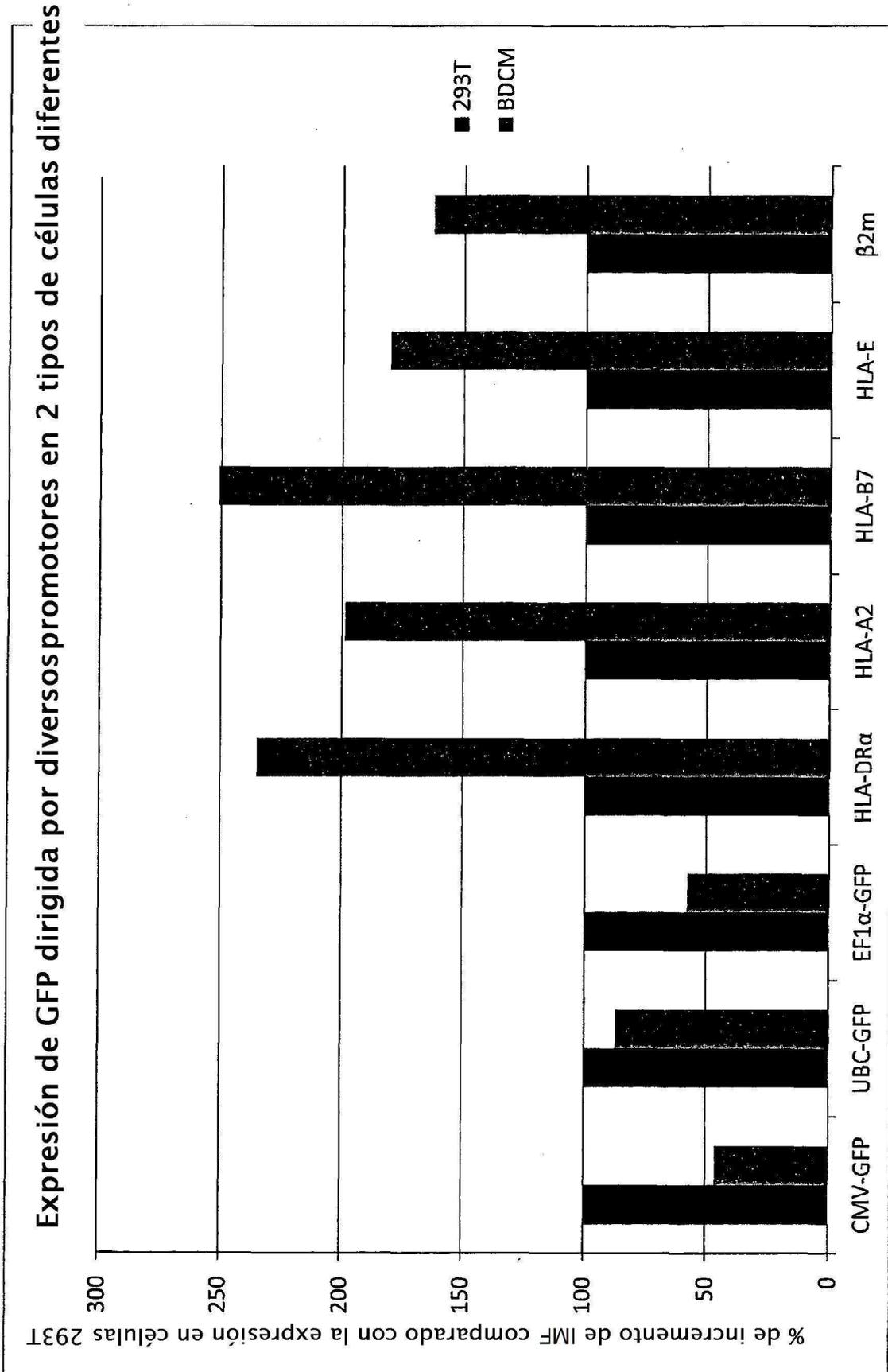


Figura 2

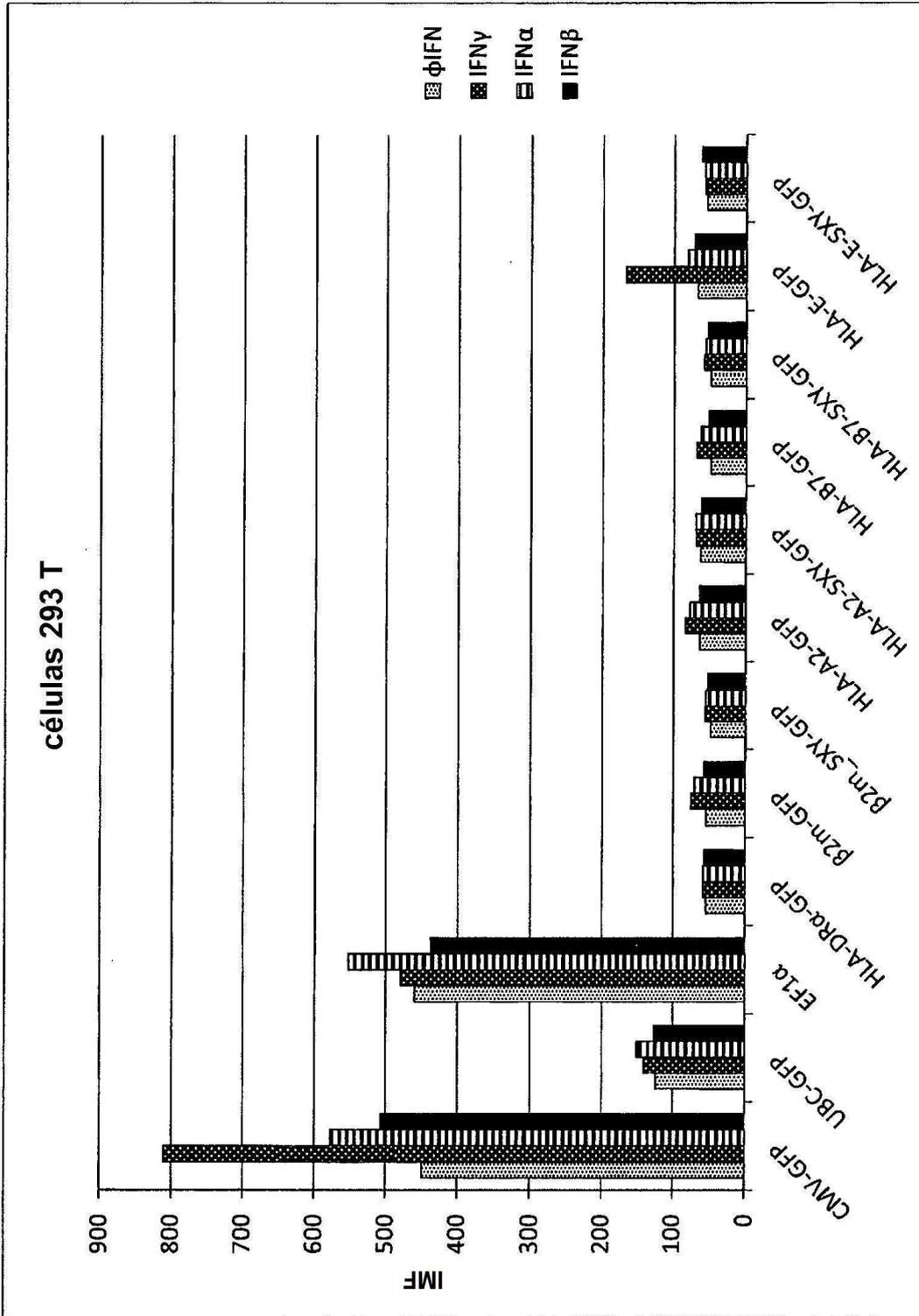


Figura 3A

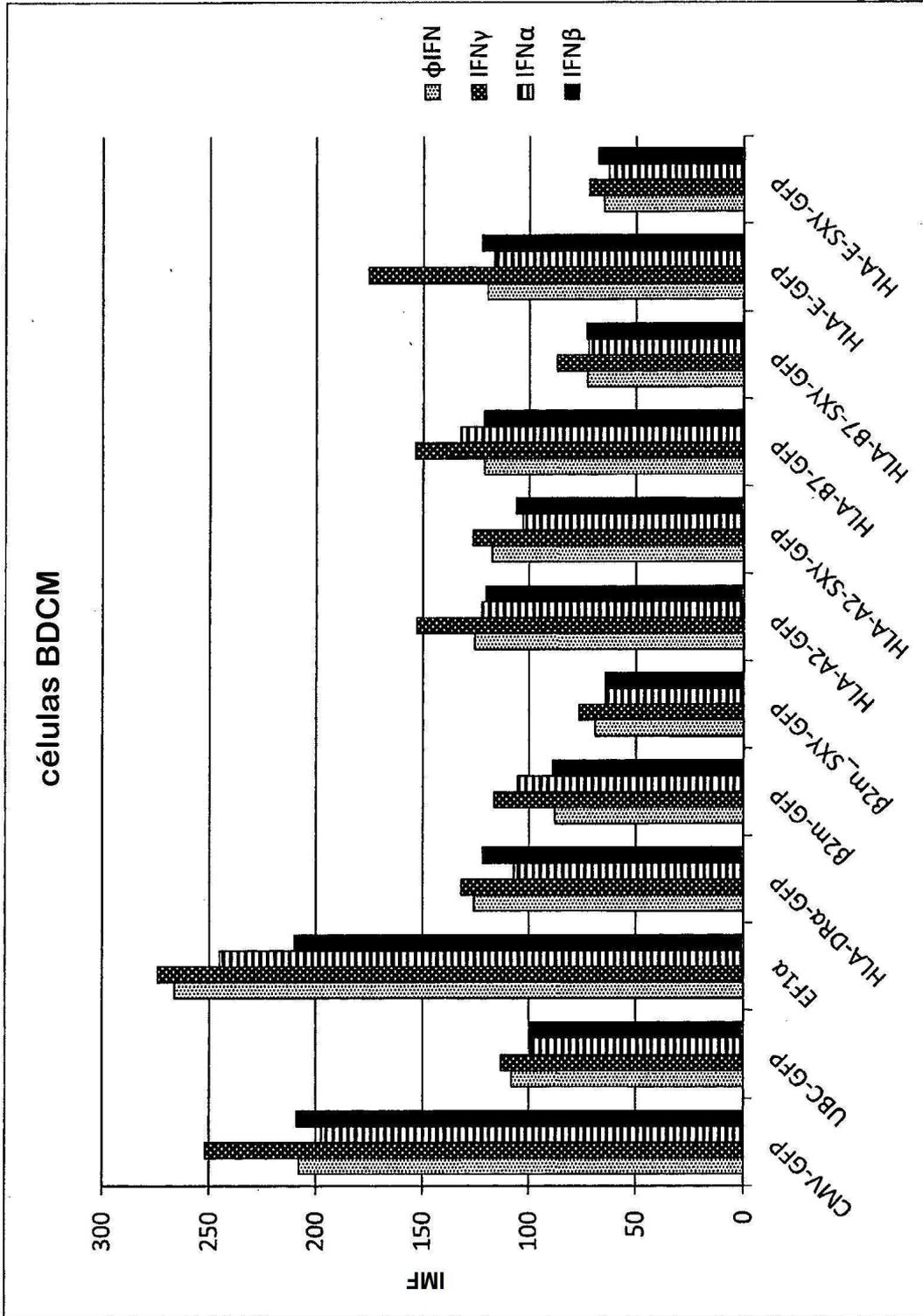


Figura 3B

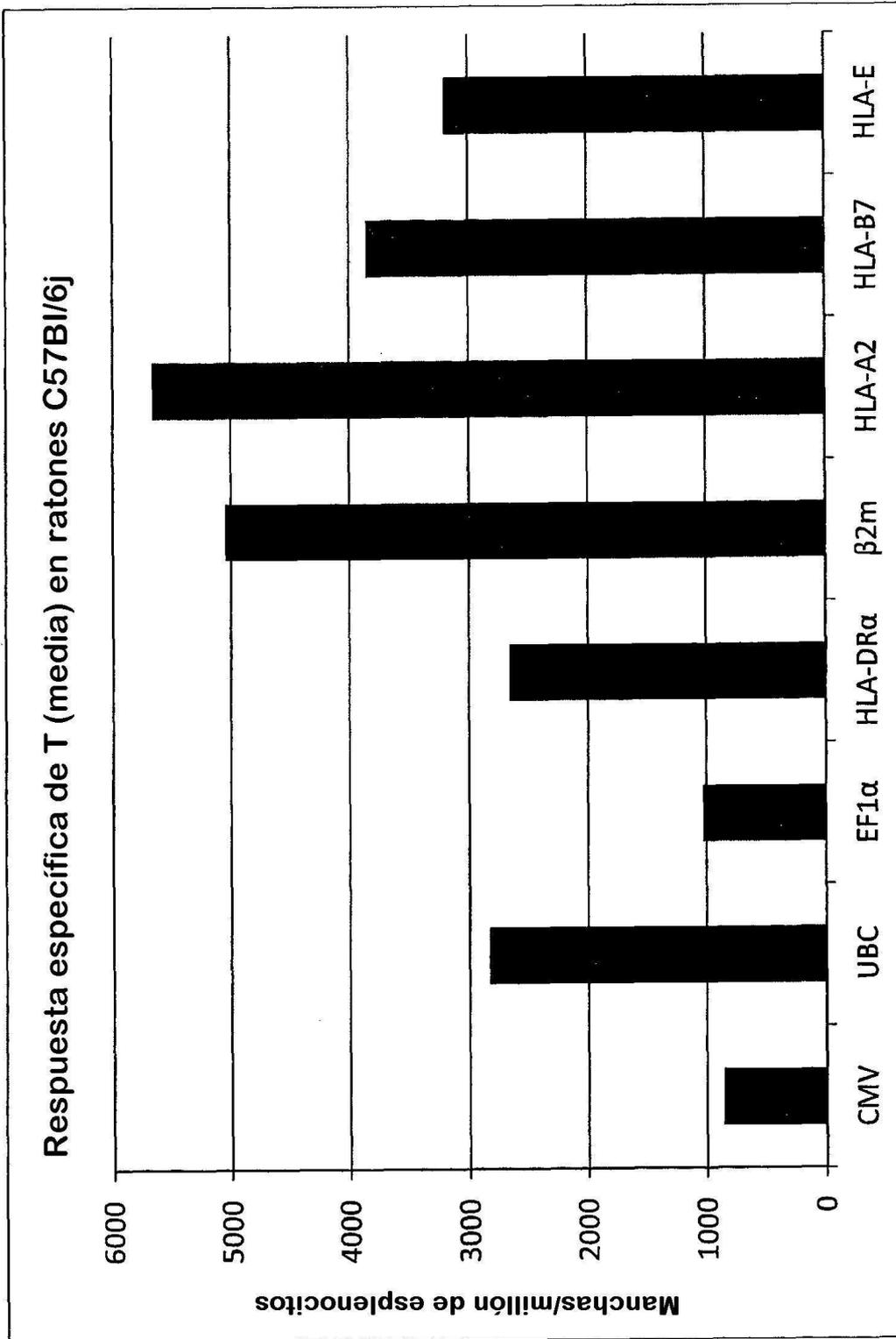


Figura 4