

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 617 749**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/867** (2006.01)

**C12N 5/10** (2006.01)

**C07K 16/00** (2006.01)

**C12N 15/86** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.01.2011 PCT/US2011/020578**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.07.2011 WO2011085247**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.01.2011 E 11732231 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.12.2016 EP 2521789**

54 Título: **Vectores y procedimientos para la transducción de linfocitos B**

30 Prioridad:

**08.01.2010 US 293522 P**

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

**19.06.2017**

73 Titular/es:

**IMMUSOFT CORPORATION (100.0%)  
2800 Elliott Avenue Suite 414  
Seattle, WA 98121, US**

72 Inventor/es:

**SCHOLZ, MATTHEW, REIN y  
HERBIG, ERIC, J.**

74 Agente/Representante:

**SALVA FERRER, Joan**

**Observaciones:**

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

ES 2 617 749 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 y procedimientos para la transducción de linfocitos B

## 5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Campo de la invención

10 **[0001]** La presente descripción se refiere a la modificación genética de linfocitos B, una población de células normalmente muy resistentes a la transducción, y a la diferenciación o activación de los mismos para expresar una proteína de interés tal como un anticuerpo específico.

Descripción de la técnica relacionada

15 **[0002]** Después de salir de la médula ósea, el linfocito B actúa como una célula presentadora de antígeno (APC) e internaliza antígenos. El antígeno es recogido por el linfocito B a través de la endocitosis mediada por receptor y es procesado. El antígeno es procesado en péptidos antigénicos, cargado en moléculas MHC II y presentado en la superficie extracelular de linfocitos B a linfocitos T cooperadores CD4+. Estos linfocitos T se unen a la molécula MHC II/antígeno y producen la activación del linfocito B. Tras la estimulación por un linfocito T, el linfocito  
20 B activado empieza a diferenciarse en células mas especializadas. Los linfocitos B del centro germinal se pueden diferenciar en linfocitos B de memoria o células plasmáticas. La mayoría de estos linfocitos B se convertirán en plasmablastos, y finalmente en células plasmáticas, y empiezan a producir grandes volúmenes de anticuerpos (véase, p. ej., *Trends Immunol.* 2009 June; 30(6): 277-285; *Nature Reviews*, 2005, 5:231-242).

25 **[0003]** La célula sanguínea más inmadura que se considera una célula plasmática en lugar de un linfocito B es el plasmablasto. Los plasmablastos segregan más anticuerpos que los linfocitos B, pero menos que las células plasmáticas. Se dividen rápidamente y todavía son capaces de internalizar antígenos y presentarlos a los linfocitos T. Una célula puede permanecer en este estado durante varios días, y después bien morir o diferenciarse irrevocablemente en una célula plasmática completamente diferenciada madura.

30 **[0004]** Las células plasmáticas definitivamente diferenciadas expresan relativamente pocos antígenos de superficie, y no expresan marcadores celulares pan-B comunes, tales como CD19 y CD20. En cambio, las células plasmáticas son identificadas por citometría de flujo por su expresión adicional de CD38, CD78, el receptor de interleuquina 6 y la falta de expresión de CD45. En seres humanos, CD27 es un buen marcador para células  
35 plasmáticas, los linfocitos B indiferenciados son CD27-, los linfocitos B de memoria son CD27+ y las células plasmáticas son CD27++. CD38 y CD138 son expresados con niveles altos (Véase Wikipedia, The Free Encyclopedia., "Plasma cell" Page Version ID: 404969441; Fecha de la última revisión: 30 de diciembre de 2010 09:54 UTC, recuperado el 4 de enero, 2011; Véase también: *Trends Immunol.* 2009 June; 30(6): 277-285; *Nature Reviews*, 2005, 5:231-242; *Nature Med.* 2010, 16:123-129; Neuberger, M. S.; Honjo, T.; Alt, Frederick W. (2004).  
40 *Molecular biology of B cells*. Amsterdam: Elsevier. pp. 189-191; Bertil Glader; Greer, John G.; John Foerster; Rodgers, George G.; Paraskevas, Frixos (2008). *Wintrobe's Clinical Hematology*, 2-Vol. Set. Hagerstown, MD: Lippincott Williams & Wilkins. pp. 347; Walport, Mark; Murphy, Kenneth; Janeway, Charles; Travers, Paul J. (2008). *Janeway's immunobiology*. New York: Garland Science. pp. 387-388; Rawstron AC (May 2006). "Immunophenotyping of plasma cells". *Curr Protoc Cytom*.

45 **[0005]** Los retrovirus pseudotipo convencionales han demostrado insuficiente infectividad de diferentes tejidos y células. Por ejemplo, una variedad de citoblastos que incluyen citoblastos hematopoyéticos y linfocitos B y T en reposo, pueden ser células diana importantes en la terapia génica o similar (Y. Hanazono, *Molecular Medicine*, Vol. 36, No. 7, 1999), pero la mayoría de estos tipos de células se encuentran en un estado de no división (Abkowitz,  
50 J. L. et al., *Nat Med*, 2 (2), 190-7, 1996). En general, es difícil introducir genes usando el vector retroviral que presenta infectividad baja contra dichas células que no se dividen.

**[0006]** Frecha y col., recientemente mostraron que los linfocitos T y B en reposo se pueden transducir eficazmente con vectores retrovirales pseudotipados con virus del sarampión, glucoproteínas, H y F, en sus  
55 superficies (*Blood* 2009 Oct 8; 1 14(15):3173-80; *Blood* 2008 1 12:4843-4852). En particular, estos vectores retrovirales usaban el virus del sarampión de Edmonston. Esta técnica para modificar células que no se dividen es de particular importancia para la terapia génica e inmunoterapia. Sin embargo, la capacidad para diferenciar y activar linfocitos B in vitro es una etapa importante en la preparación de linfocitos B modificados para infusión en sujetos. Los linfocitos B activados y que se dividen tampoco se modifican genéticamente de forma fácil, por lo tanto, este

procedimiento se puede usar para transducir todos los tipos de linfocitos B. La presente descripción proporciona vectores y procedimientos para modificar y diferenciar/activar linfocitos B, de modo que se puedan usar eficazmente en aplicaciones profilácticas y terapéuticas.

5 **[0007]** Funke y col., (2008) describieron la entrada en células diana de vectores lentivíricos (*Molecular Therapy* 16(8) 1427-1436) y Funke y col., (2009) describieron el pseudotipado lentivírico con glucoproteínas del sarampión naturales para mejorar el título y selectividad (*Gene Therapy* 16(5) 700-5).

10 **[0008]** La presente descripción proporciona estas y otras ventajas como se describen en la descripción detallada.

#### BREVE RESUMEN DE LA INVENCIÓN

15 **[0009]** La invención proporciona un procedimiento para expresar un ácido nucleico de interés en una célula plasmática como se define en las reivindicaciones.

20 **[0010]** También se describe en el presente documento un procedimiento para expresar un ácido nucleico de interés en un linfocito B, que comprende, transducir un linfocito B en reposo con un vector retrovívico pseudotipado con glucoproteínas del virus del sarampión H y F, en el que dicho vector retrovívico comprende el ácido nucleico de interés unido operativamente a un promotor; y poner en contacto los linfocitos B en reposo transducidos con una composición que comprende CD40L en combinación con un factor de activación de linfocitos B que comprende uno o más de los factores seleccionados del grupo que consiste en IL- 2, IL-7, IL-10 y CpG; en condiciones suficientes para diferenciar los linfocitos B transducidos en una célula plasmática, de modo que los linfocitos B transducidos diferenciados expresen el ácido nucleico de interés. En una realización del procedimiento, el vector retrovívico es un vector lentivírico. En otra realización del procedimiento, el ácido nucleico de interés comprende un ácido nucleico que codifica al menos una región VL y VH de inmunoglobulina. En una realización adicional del procedimiento, el ácido nucleico de interés codifica una proteína de anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno de la misma, una proteína de fusión o una molécula pequeña codificada por ADN. En otra realización adicional más, el anticuerpo es un anticuerpo dirigido contra el VIH, un anticuerpo dirigido contra el ARN o un anticuerpo que se une a una proteína implicada en la regulación inmunitaria. En otra realización, se proporciona CD40L en una célula o una línea celular o se puede unir a una placa de cultivo tisular o una perla. En algunas realizaciones de los procedimientos descritos en el presente documento, el promotor es un promotor específico de linfocitos B y en particular es un promotor de EEK.

35 **[0011]** Otro aspecto proporciona un procedimiento para expresar un ácido nucleico de interés en un linfocito B, que comprende transducir un linfocito B en reposo con un vector retrovívico pseudotipado con glucoproteínas del virus del sarampión, H y F, en el que dicho vector retrovívico comprende el ácido nucleico de interés operativamente unido a un promotor, en condiciones suficientes para transducir al menos 20% de los linfocitos B en reposo; y poner en contacto los linfocitos B en reposo transducidos con una composición que comprende CD40L en combinación con un factor de activación de linfocitos B que comprende uno o más de los factores seleccionados del grupo que consiste en IL- 2, IL-7, IL-10 y CpG; en condiciones suficientes para diferenciar los linfocitos B transducidos en una célula plasmática, de modo que al menos 20% de los linfocitos B transducidos expresen el ácido nucleico de interés.

45 **[0012]** En una realización de los procedimientos descritos en el presente documento, los linfocitos B en reposo se aíslan de la sangre. En una realización adicional de los procedimientos descritos en el presente documento, las células plasmáticas se pueden caracterizar por la expresión en la superficie celular de uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en CD38, CD78, receptor de interleuquina 6, CD27alto y CD138.

50 **[0013]** Un aspecto adicional de la descripción proporciona un procedimiento para la transducción y promoción de la activación de linfocitos B en reposo que comprende, poner en contacto los linfocitos B en reposo con un vector retrovívico pseudotipado con glucoproteínas del virus del sarampión, H y F, en el que dicho vector retrovívico comprende el ácido nucleico de interés operativamente unido a un promotor, en condiciones suficientes para transducir al menos 20% de los linfocitos B en reposo; y poner en contacto los linfocitos B transducidos con una composición que comprende CD40L en combinación con un factor de activación de linfocitos B tal como uno o más de los factores seleccionados del grupo que consiste en IL-2, IL-10, *Staphylococcus aureus* Cowan I (SAC), PMA y CpG; en condiciones suficientes para activar los linfocitos B transducidos de modo que al menos 20% de los linfocitos B transducidos expresen el ácido nucleico de interés. En una realización, el vector retrovívico es un vector lentivírico. En una realización adicional, el ácido nucleico de interés comprende un ácido nucleico que codifica al menos una región VL y VH de inmunoglobulina. En realizaciones adicionales, el ácido nucleico de interés comprende un ácido nucleico que codifica el interferón  $\beta$ . En relación con esto, en otras realizaciones, el ácido nucleico de

interés puede codificar cualquiera de una variedad de citoquinas tales como, pero no limitadas a IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, IL-30, IL-31, IL-32, IL-33, IL-34 e IL-35, IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\omega$ , quimioquinas tipo C XCL1 y XCL2, quimioquinas tipo C-C (que incluyen hasta la fecha CCL1-CCL28) y quimioquinas tipo CXC (que incluyen hasta la fecha CXCL1-CXCL17), y miembros de la superfamilia del TNF (p.ej., TNF- $\alpha$ , ligando 4-1BB, factor de activación de linfocitos B (BLyS), ligando FAS, linfotóxina, OX40L RANKL y TRAIL). En otra realización, el ácido nucleico de interés codifica una proteína de anticuerpo, un fragmento de unión al antígeno de la misma. En otra realización más, el CD40L se proporciona en una célula o una línea celular o se puede unir a una placa de cultivo tisular o una perla. En una realización particular, el promotor es un promotor específico de linfocitos B. En algunas realizaciones, el linfocito B es activado y se diferencia en una célula plasmática que expresa la proteína de interés.

[0014] Estos y otros aspectos de la invención serán evidentes tras referencia a la siguiente descripción detallada y dibujos adjuntos.

15

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0015] La figura 1 es una gráfica de barras que muestra la producción de anticuerpo b12 en linfocitos B diferenciados transducidos.

20

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0016] La presente descripción se refiere en general a modificar genéticamente linfocitos B para expresar un gen de interés, y cultivar los linfocitos B modificados de modo que se diferencien y activarlos para que expresen la proteína codificada por el gen de interés. Después, estos linfocitos B modificados activados se administran a un sujeto.

25

[0017] La composición y procedimientos descritos en el presente documento proporcionan sorprendentemente la capacidad de transducir linfocitos B derivados, por ejemplo, de una simple extracción de sangre, con un ácido nucleico de interés y cultivar los linfocitos B modificados de modo que se desarrollen en células plasmáticas (linfocitos B activados) que segregan cantidades abundantes de la proteína codificada por el ácido nucleico de interés. Una ventaja particular de este sistema es que solo requiere aproximadamente 10 días para producir una proteína de interés, a diferencia de sistemas conocidos en la técnica que pueden tardar tanto como 10 semanas. Por lo tanto, la presente descripción proporciona procedimientos que requieren menos tiempo de cultivo, proporcionando ventajas comerciales y de seguridad comparado con los procedimientos previos.

35

### Procedimientos de cultivo y transducción de linfocitos B

[0018] El ejemplo prototípico de células para usar con los procedimientos de transducción de la descripción son los linfocitos B.

40

[0019] En algunas realizaciones, los linfocitos B que se van a usar en los procedimientos de esta descripción pueden ser linfocitos B en reposo, linfocitos B cebados o activados, células de mieloma, linfocitos B de leucemia linfocítica, o linfocitos B de linfoma. Sin embargo, un experto en la técnica apreciará fácilmente que los vectores y procedimientos de la descripción se pueden aplicar a otros tipos de células. A modo de ejemplo, los tipos de células que se pueden modificar y activar incluyen cualquier célula que típicamente no se divide o quiescente tal como neuroblastos, citoblastos hematopoyéticos y células progenitoras hematopoyéticas (células CD34<sup>+</sup>), citoblastos mesenquimales, células progenitoras mesenquimales, citoblastos y células progenitoras neurales y hepáticas, células dendríticas, linfocitos T (linfocitos T CD8<sup>+</sup> o CD4<sup>+</sup>), otras poblaciones de leucocitos, citoblastos pluripotentes, citoblastos multipotentes, etc. Por consiguiente, algunas realizaciones de la presente descripción proporcionan poblaciones de células que resultan de esta metodología. En algunas realizaciones, los procedimientos y vectores descritos en el presente documento se pueden usar para transducir cualquier otro tipo de célula deseado, tales como hepatocitos, células epiteliales, osteoblastos, miocitos, fibroblastos, adipocitos, etc.

50

[0020] "Quiescente", como se usa en el presente documento, se refiere a un estado de la célula en el que la célula no está proliferando activamente.

55

[0021] Antes de la transducción y diferenciación, se obtiene una fuente de linfocitos B de un sujeto. El término "sujeto" se pretende que incluya organismos vivos en los que se puede producir una respuesta inmunitaria

adaptativa (p. ej., mamíferos). Los ejemplos de sujetos incluyen seres humanos, perros, gatos, ratones, ratas y especies transgénicas de los mismos. Los linfocitos B se pueden obtener de una serie de fuentes, que incluyen células mononucleares de sangre periférica, médula ósea, tejido de ganglios linfáticos, sangre de cordón, tejido de un sitio de infección, tejido de bazo y tumores. En algunas realizaciones de la presente descripción, se puede usar cualquier número de líneas de linfocitos B disponibles en la técnica. En algunas realizaciones de los procedimientos descritos en el presente documento, los linfocitos B se pueden obtener de una unidad de sangre recogida de un sujeto usando cualquiera de una serie de técnicas conocidas por el experto en la materia, tales como separación con FICOLL™ (copolímeros de sacarosa y epíclorhidrina que se pueden usar para preparar soluciones de alta densidad). En una realización preferida, las células de la sangre que circula de un individuo se obtienen por aféresis o leucaféresis. El producto de la aféresis típicamente contiene linfocitos, que incluyen linfocitos T, monocitos, granulocitos, linfocitos B, otros leucocitos nucleados, eritrocitos y plaquetas. En una realización, las células recogidas por aféresis se pueden lavar para separar la fracción de plasma y poner las células en un tampón o medio adecuado para las posteriores etapas de procesamiento. En una realización de los procedimientos descritos en el presente documento, las células se lavan con solución salina tamponada con fosfato (PBS). En una realización alternativa, la solución de lavado carece de calcio y puede carecer de magnesio o puede carecer de muchos, sino todos, los cationes divalentes. Como apreciarán fácilmente los expertos en la técnica, se puede llevar a cabo una etapa de lavado por procedimientos conocidos en la técnica, tales como usando una centrífuga de "flujo continuo" (por ejemplo, el procesador celular Cobre 2991) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de lavado, las células se pueden volver a suspender en una variedad de tampones biocompatibles, tales como, por ejemplo, PBS. Alternativamente, los componentes no deseables de la muestra de aféresis se pueden separar y directamente volver a suspender las células en medio de cultivo.

**[0022]** Los linfocitos B se pueden aislar de sangre periférica o leucaféresis usando técnicas conocidas en la materia. Por ejemplo, las PBMC se pueden aislar usando FICOLL™ (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) y purificar los linfocitos B CD19+ por selección negativa o positiva usando cualquiera de una variedad de anticuerpos conocidos en la técnica, tales como el sistema de complejo tetramérico Rosette (StemCell Technologies, Vancouver, Canadá). Están disponibles en el comercio otros kits de aislamiento, tales como R&D Systems' MagCelect Human B Cell Isolation Kit (Minneapolis, MN).

**[0023]** En algunas realizaciones, los linfocitos B en reposo se pueden preparar por sedimentación en gradientes Percoll discontinuos, como se describe en (Defranco et al., (1982) *J. Exp. Med.* 155:1523). En resumen, las células aisladas de la interfase de Percoll al 70-75% (densidad de 1,087-1,097) típicamente son >95% mlg<sup>+</sup>, tienen un grado bajo, uniforme de dispersión de la luz hacia delante y no responden a la Con A.

**[0024]** Los linfocitos B, u otras células de interés, se pueden transducir con vectores retrovíricos descritos en el presente documento usando cualquiera de una variedad de técnicas conocidas en la materia (véase, p. ej., *Science* 12 April 1996 272: 263-267; *Blood* 2007, 99:2342-2350; *Blood* 2009, 113:1422-1431; *Blood* 2009 Oct 8;114(15):3173-80; *Blood*. 2003;101 (6):2167-2174; *Current Protocols in Molecular Biology or Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, New York, N.Y. (2009)). Por ejemplo, las PBMC, linfocitos B o T de donantes y otros linfocitos B de células de cáncer tales como B-CLL se pueden aislar y cultivar en RPMI 1640 (GibcoBRL Invitrogen, Auckland, Nueva Zelanda) u otro medio adecuado, sea exento de suero o complementado con FCS al 10% y penicilina/estreptomicina y/u otros complementos adecuados. En algunas realizaciones, las células se siembran con 1 E5 células en placas de 48 pocillos y se añade vector concentrado en diferentes dosis que puede optimizar de forma rutinaria el experto usando metodologías rutinarias. En algunas realizaciones, los linfocitos B se pueden transferir a monocapa celular MS5 en RPMI complementado con suero AB al 10%, FCS al 5%, rhSCF 50 ng/ml, rhIL-15 10 ng/ml y rhIL-2 5 ng/ml, y renovar el medio periódicamente según sea necesario. Como reconocerá el experto en la materia, se pueden usar otros medios y complementos adecuados según convenga.

**[0025]** En una realización, los linfocitos B se ponen en contacto con un vector retrovírico como se describe en el presente documento, que comprende un ácido nucleico de interés operativamente unido a un promotor, en condiciones suficientes para transducir al menos una parte de los linfocitos B. En una realización, los linfocitos B se ponen en contacto con un vector retrovírico, como se describe en el presente documento, que comprende un ácido nucleico de interés operativamente unido a un promotor, en condiciones suficientes para transducir al menos 20% de los linfocitos B en reposo. En una realización adicional, los linfocitos B se ponen en contacto con un vector como se describe en el presente documento, en condiciones suficientes para transducir al menos 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o incluso 100% de los linfocitos B en reposo. Cuando se transducen linfocitos B activados, los linfocitos B activados se ponen en contacto con un vector como se describe en el presente documento, en condiciones suficientes para transducir al menos 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o incluso 100% de los

linfocitos B activados.

- [0026]** En algunas realizaciones, las células son activadas en el momento de la transducción. En relación con esto, las células se pueden estimular previamente con *Staphylococcus Aureus* Cowan (SAC; Calbiochem, San Diego, CA); IL-2 para linfocitos B o con anticuerpos anti-hCD3/anti-hCD28/IL-2 para linfocitos T, en concentraciones adecuadas conocidas para el experto en la materia y optimizadas de forma rutinaria. Se pueden usar otros factores de activación de linfocitos B (p. ej., PMA), como conoce el experto en la materia y se describe en el presente documento.
- 10 **[0027]** La presente descripción proporciona procedimientos de cultivo de linfocitos B transducidos para así promover la diferenciación y activación de modo que los linfocitos B produzcan activamente la proteína codificada rengénica. En relación con esto, los linfocitos B se activan y se diferencian en células plasmáticas. Como reconocería un experto en la materia, las células plasmáticas se pueden identificar por patrones de expresión de proteínas de superficie celular usando procedimientos de citometría de flujo estándar. Por ejemplo, las células plasmáticas diferenciadas definitivamente expresan relativamente pocos antígenos de superficie, y no expresan marcadores celulares pan-B comunes, tales como CD19 y CD20. En su lugar, las células plasmáticas son identificadas por citometría de flujo por su expresión adicional de CD38, CD78, el receptor de interleuquina 6 y la falta de expresión de CD45. En seres humanos, CD27 es un buen marcador para las células plasmáticas, los linfocitos B indiferenciados son CD27-, los linfocitos B de memoria son CD27+ y las células plasmáticas son CD27++. CD38 y CD138 son expresados con niveles altos.
- 15 **[0028]** En algunas realizaciones, puede ser conveniente diferenciar y activar linfocitos B antes de la transducción. Por consiguiente, cualquiera de dichos procedimientos está contemplado en el presente documento para usar con células no transducidas.
- 20 **[0029]** En una realización, los linfocitos B se pueden poner en contacto con un factor de activación de linfocitos B, p. ej., cualquiera de una variedad de citoquinas, factores de crecimiento o líneas celulares que se sabe que activan y/o diferencian linfocitos B (véase, p. ej., Fluckiger, et al. *Blood* 1998 92: 4509-4520; Luo, et al., *Blood* 2009 113: 1422-1431). Dichos factores se pueden seleccionar del grupo que consiste en, pero no se limita a, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, IL-30, IL-31, IL-32, IL-33, IL-34, e IL-35, IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\omega$ , quimioquinas de tipo C XCL1 y XCL2, quimioquinas de tipo C-C (que incluyen hasta la fecha CCL1-CCL28) y quimioquinas de tipo CXC (que incluyen hasta la fecha CXCL1-CXCL17), y miembros de la superfamilia del TNF (p. ej., TNF- $\alpha$ , ligando 4-1BB, factor de activación de linfocitos B (BLyS), ligando FAS, linfotóxina, OX40L RANKL y TRAIL). En particular, los linfocitos B transducidos (o linfocitos B antes de la transducción) se pueden poner en contacto o cultivar en células nutrientes. En algunas realizaciones, las células nutrientes son una línea de células estromales, p. ej., las líneas de células estromales murinas S17 o MS5. En una realización adicional, se pueden cultivar células CD19+ purificadas en presencia de fibroblastos que expresan el ligando CD40 en presencia de factores de activación de linfocitos B citoquinas tales como IL-10 y IL-4. El CD40L también se puede proporcionar unido a una superficie tal como una placa de cultivo tisular o una perla. En otra realización, las células CD19+ purificadas se pueden cultivar en presencia de células nutrientes que expresan CD40L en presencia de una o más citoquinas o factores seleccionados de IL-10, IL-4, IL-7, CpG DNA, IL-2, IL-15, IL6 e IFN- $\alpha$ .
- 30 **[0030]** En otra realización, los factores de activación de linfocitos B se pueden proporcionar por transfección en el linfocito B u otra célula nutriente. En este contexto, se pueden usar uno o más factores que promueven la diferenciación del linfocito B en una célula que segrega anticuerpos y/o uno más factores que promueven la longevidad de la célula que produce anticuerpos. Dichos factores incluyen, por ejemplo, Blimp-1, TRF4, factores antiapoptóticos tales como Bcl-xl o Bcl5, mutantes del receptor de CD40 constitutivamente activos. También se pueden usar factores adicionales que promueven la expresión de moléculas de señalización en la dirección 3' tales como factores asociados con el receptor de TNF (TRAF) en la activación/diferenciación de los linfocitos B. En relación con esto, la activación de células, supervivencia celular y funciones antiapoptóticas de la superfamilia de receptores de TNF, son mediadas principalmente por TRAF1-6 (véase, p. ej., R.H. Arch, et al., *Genes Dev.* 12 (1998), pp. 2821-2830). Los efectores en la dirección 3' de la señalización de TRAF incluyen factores de transcripción en la familia de NF- $\kappa$ B y AP-1 que pueden poner en marcha genes implicados en diferentes aspectos de las funciones celular e inmunitaria. Además, se ha mostrado que la activación de NF- $\kappa$ B y AP-1 proporciona protección a las células frente a la apoptosis a través de la transcripción de genes antiapoptóticos.
- 40 **[0031]** En una realización adicional, pueden ser útiles proteínas derivadas del virus de Epstein Barr (EBV) para la activación/diferenciación de linfocitos B o para promover la longevidad de la célula que produce anticuerpos.
- 45
- 50
- 55

Las proteínas derivadas del EBV incluyen, pero no se limitan a, EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3, LMP-1, LMP-2, EBER, miARN, EBV-EA, EBV-MA, EBV-VCA y EBV-AN.

**[0032]** El contacto de los linfocitos B con factores de activación de linfocitos B usando los procedimientos proporcionados en el presente documento, conduce a, entre otras cosas, la proliferación celular, modulación del fenotipo de superficie celular IgM<sup>+</sup> a uno concordante con un linfocito B maduro activado, secreción de Ig y cambio de isotipo. Los linfocitos B CD19<sup>+</sup> se pueden aislar usando kits de separación de células conocidos y disponibles en el comercio, tales como el sistema de separación de células MiniMacs (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Alemania). En algunas realizaciones, los fibroblastos CD40L son irradiados antes de usar en los procedimientos descritos en el presente documento.

**[0033]** En una realización adicional, las células progenitoras o linfocitos B se pueden cultivar en presencia de uno o más de IL-3, IL-7, ligando Flt3, trombopoyetina, SCF, IL-2, IL-10, G-CSF y CpG. En algunas realizaciones, los procedimientos incluyen cultivar los linfocitos B o progenitores en presencia de uno o más de los factores mencionados antes junto con células estromales transformadas (p. ej., MS5) proporcionando un nivel bajo de CD40L anclado o CD40L unido a una placa o una perla.

**[0034]** Se puede usar cualquiera de una variedad de medios de cultivo en los presentes procedimientos, como sabrá el experto en la materia (véase, p. ej., *Current Protocols in Cell Culture*, 2000-2009 de John Wiley & Sons, Inc.). En una realización, los medios para usar en los procedimientos descritos en el presente documento incluyen, pero no se limitan a medio Dulbecco modificado por Iscove (con o sin suero bovino fetal u otro suero adecuado). Los medios ilustrativos también incluyen, pero no se limitan a, RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM,  $\alpha$ -MEM, F-12, X-Vivo 15, y X-Vivo 20. En realizaciones adicionales, el medio puede comprender un tensioactivo, un anticuerpo, Plasmanate o un agente de reducción (p. ej. N-acetil-cisteína, 2-mercaptoetanol), o uno o más antibióticos. En algunas realizaciones, se puede usar también IL6, CD40L soluble y un potenciador de la reticulación.

**[0035]** Los linfocitos B o células progenitoras se pueden cultivar en condiciones y durante periodos de tiempo suficientes para lograr la diferenciación y activación deseados. En algunas realizaciones, los linfocitos B o células progenitoras se cultivan en condiciones y durante periodos de tiempo suficientes de modo que 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o incluso 100% de los linfocitos B se diferencian y/o activan como se desea. En una realización, los linfocitos B se activan y se diferencian en células plasmáticas. Como reconocerá el experto en la materia, las células plasmáticas se pueden identificar por patrones de expresión de proteínas de superficie celular usando procedimientos estándar de citometría de flujo, como se describe en otra parte en el presente documento, tal como por la expresión de CD38, CD78, el receptor de interleuquina 6, CD27<sup>alto</sup>, CD138, y la falta de expresión de marcadores celulares pan-B comunes, tales como CD19 y CD20 y la falta de expresión de CD45.

**[0036]** En algunas realizaciones, las células se cultivan durante 1-7 días. En realizaciones adicionales, las células se cultivan 7, 14, 21 días o más. Por lo tanto, las células se pueden cultivar en condiciones adecuadas durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o más días. Las células se vuelven a poner en placa, se pueden añadir o cambiar medio y complementos según sea necesario, usando técnicas conocidas en la materia.

**[0037]** En algunas realizaciones, los linfocitos B transducidos o células progenitoras se pueden cultivar en condiciones y durante periodos de tiempo suficientes de modo que al menos 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de las células se diferencian y activan para producir Ig y/o para expresar el transgén de interés.

**[0038]** La inducción de activación de linfocitos B se puede medir por técnicas tales como incorporación de <sup>3</sup>H-uridina en ARN (cuando se diferencian los linfocitos B, aumenta la síntesis de ARN), o por incorporación de <sup>3</sup>H-timidina, que mide la síntesis de ADN asociada con la proliferación celular. Para la medición óptima de la proliferación de linfocitos B, se puede añadir interleuquina 4 (IL-4) al medio de cultivo en una concentración adecuada, tal como aproximadamente 10 ng/ml.

**[0039]** Alternativamente, la activación de linfocitos B se puede medir como función de la secreción de inmunoglobulina. Por ejemplo, se puede añadir CD40L a los linfocitos B en reposo junto con IL-4 (p. ej., 10 ng/ml) e IL-5 (p. ej., 5 ng/ml) u otras citoquinas adecuadas para la activación de linfocitos B. También se puede usar la citometría de flujo para medir marcadores de superficie celular típicos de linfocitos B activados. Véase, p. ej., Civin CI, Loken MR, *Int'l J. Cell Cloning* 1987; 5:1-16; Loken, MR, et al., "Flow Cytometry Characterization of Erythroid,

Lymphoid and Monomyeloid Lineages in Normal Human Bone Marrow", en *Flow Cytometry in Hematology*, Laerum OD, Bjerksnes R. eds., Academic Press, New York 1992; pp. 31-42; y LeBein TW, et al., *Leukemia* 1990; 4:354-358.

**[0040]** Después de cultivar durante un periodo de tiempo adecuado, tal como de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o más días, en general aproximadamente 3 días, se puede añadir un volumen adicional de medio de cultivo. Se puede recoger el líquido sobrenadante de cultivos individuales en diferentes tiempos durante el cultivo y cuantificar la IgM e IgG<sub>1</sub> como describen Noelle et al., (1991) *J. Immunol.* 146:1118-1124. En realizaciones adicionales, los cultivos se pueden recoger y medir la expresión del transgén de interés usando citometría de flujo, ELISA, ELISPOT u otro ensayo conocido en la técnica.

**[0041]** En realizaciones adicionales, se puede usar el enzoinmunoanálisis de adsorción (ELISA) para medir la IgM u otra producción de isotipo de anticuerpo o para la producción del transgén de interés. En algunas realizaciones, las determinaciones de IgG se pueden hacer usando anticuerpos disponibles en el comercio tales como anticuerpo de cabra dirigido contra IgG humana, como anticuerpo de captura, seguido de detección usando cualquiera de una variedad de reactivos de detección adecuados tales como anticuerpo de cabra dirigido contra Ig humana biotinilado, estreptavidina, fosfatasa alcalina y sustrato.

#### Vectores víricos

**[0042]** Algunas realizaciones usan vectores víricos para transducir células plasmáticas tales como linfocitos B con los sistemas de expresión descritos en el presente documento. Los ejemplos de vectores víricos incluyen, sin limitación, vectores basados en adenovirus, vectores basados en virus adenoasociados (AAV), vectores retrovíricos, vectores retrovíricos-adenovíricos, y vectores derivados del virus herpes simple (HSV), incluyendo vectores amplicones, HSV de replicación defectuosa y HSV atenuado (véase, p. ej., Krisky, *Gene Ther.* 5: 1517-30, 1998; Pfeifer, *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2:177-211,2001).

**[0043]** Algunas realizaciones, se refieren al uso de vectores retrovíricos, o vectores derivados de retrovirus. Los "retrovirus" son virus de ARN con envuelta que son capaces de infectar células animales, y que usan la enzima transcriptasa inversa en las etapas tempranas de infección para generar una copia de ADN a partir de su genoma de ARN, que después típicamente es integrado en el genoma del hospedante. Los ejemplos de vectores retrovíricos son vectores derivados del virus de la leucemia murina Moloney (MLV), vectores retrovíricos basados en un virus de citoblastos murinos, que proporciona expresión estable a largo plazo en células diana tales como células precursoras hematopoyéticas y su progenie diferenciada (véase, p. ej., Hawley et al., *PNAS USA* 93:10297-10302, 1996; Keller et al., *Blood* 92:877-887, 1998), vectores híbridos (véase, p. ej., Choi, et al., *Stem Cells* 19:236-246, 2001), y vectores derivados de retrovirus complejos, tales como vectores lentivíricos.

**[0044]** Como se ha indicado antes, algunas realizaciones usan vectores lentivíricos. El término "lentivirus" se refiere a un género de retrovirus complejos que son capaces de infectar tanto células que se dividen como que no se dividen. Los ejemplos de lentivirus incluyen VIH (virus de inmunodeficiencia humana; que incluye VIH de tipo 1 y VIH de tipo 2), visna-maedi, el virus de la artritis-encefalitis caprina, virus de la anemia infecciosa equina, virus de inmunodeficiencia felina (FIV), virus de inmunodeficiencia bovina (BIV), y virus de inmunodeficiencia simia (SIV). Los vectores lentivíricos se pueden obtener de uno cualquiera o más de estos lentivirus (véase, p. ej., Evans et al., *Hum Gene Ther.* 10:1479-1489, 1999; Case et al., *PNAS USA* 96:2988-2993, 1999; Uchida et al., *PNAS USA* 95:11939-11944, 1998; Miyoshi et al., *Science* 283:682-686, 1999; Sutton et al., *J Virol* 72:5781-5788, 1998; y Frecha et al., *Blood.* 112:4843-52, 2008).

**[0045]** Se ha publicado que los linfocitos T y B en reposo se pueden transducir mediante un LV recubierto de VSVG que lleva la mayoría de las proteínas accesorias del VIH (vif, vpr, vpu y nef) (véase, p. ej., Frecha et al., 2010 *Mol. Therapy* 18:1748). Sin embargo, la inclusión de dichas proteínas genera problemas de seguridad. Una ventaja de los vectores descritos en el presente documento es que no son necesarias proteínas accesorias. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el vector retrovírico comprende determinadas secuencias mínimas de un genoma de lentivirus, tal como el genoma del VIH o el genoma del SIV. El genoma de un lentivirus típicamente está organizado en una región de repeticiones terminales largas 5' (LTR), el gen gag, el gen pol, el gen env, los genes accesorios (p. ej., nef, vif, vpr, vpu, tat, rev) y una región LTR 3'. La LTR vírica se divide en tres regiones denominadas U3, R (repetición) y U5. La región U3 contiene elementos potenciadores y promotores, la región U5 contiene las señales de poliadenilación, y la región R separa las regiones U3 y U5. Las secuencias transcritas de la región R aparecen en los extremos tanto 5' como 3' del ARN vírico (véase, p. ej., "RNA Viruses: A Practical Approach" (Alan J. Cann, Ed., Oxford University Press, 2000); O Narayan, *J. Gen. Virology.* 70:1617-1639, 1989; Fields et al., *Fundamental Virology Raven Press.*, 1990; Miyoshi et al., *J Virol.* 72:8150-7,1998; y patente de EE.UU. nº 6.013.516). Los

vectores lentivíricos pueden comprender uno cualquiera o más de estos elementos del genoma lentivírico, para regular la actividad del vector según se desee, o pueden contener eliminaciones, inserciones, sustituciones o mutaciones, en uno o más de estos elementos, de modo que se reduzcan los efectos patológicos de la replicación lentivírica, o se limite el vector lentivírico a una sola ronda de infección.

5

**[0046]** Típicamente, un vector retrovírico mínimo comprende algunas secuencias LTR 5' y LTR 3', uno o más genes de interés (que se van a expresar en la célula diana), uno o más promotores, y una secuencia que actúa en cis para el empaquetamiento del ARN. Se pueden incluir otras secuencias reguladoras, como se describe en el presente documento y se conocen en la materia. El vector vírico típicamente se clona en un plásmido que se puede

10

transfectar en una línea celular de empaquetamiento, tal como una célula eucariota (p. ej., 293-HEK), y típicamente también comprende secuencias útiles para la replicación del plásmido en bacterias.

**[0047]** En algunas realizaciones, el vector vírico comprende secuencias de las LTR 5' y/o 3' de un retrovirus tal como un lentivirus. Las secuencias de LTR pueden ser secuencias de LTR de cualquier lentivirus de cualquier

15

especie. Por ejemplo, pueden ser secuencias de LTR de VIH, SIV, FIV o BIV. Preferiblemente, las secuencias de LTR son secuencias de LTR del VIH.

**[0048]** En algunas realizaciones, el vector vírico comprende las secuencias R y U5 de la LTR 5' de un lentivirus y una LTR 3' inactivada o "autoinactivante" de un lentivirus. Una "LTR 3' autoinactivante" es una repetición terminal larga (LTR) 3' que contiene una mutación, sustitución o eliminación que previene que las secuencias LTR dirijan la expresión de un gen en la dirección 3'. Una copia de la región U3 de la LTR 3' actúa como un molde para la generación de ambas LTR en el provirus integrado. Por lo tanto, cuando la LTR 3' con una eliminación o mutación inactivante se integra como la LTR 5' del provirus, no es posible la transcripción a partir de la LTR 5'. Esto elimina la competición entre el potenciador/promotor vírico y cualquier potenciador/promotor interno. Las LTR 3' autoinactivantes se describen, por ejemplo, en Zufferey et al., *J Virol.* 72:9873-9880, 1998; Miyoshi et al., *J Virol.* 72:8150-8157, 1998; y Iwakuma et al., *Virology* 261:120-132, 1999.

20

25

**[0049]** Las LTR 3' autoinactivantes se pueden generar por cualquier procedimiento conocido en la técnica. En algunas realizaciones, el elemento U3 de las LTR 3' contiene una eliminación de su secuencia potenciadora, preferiblemente la caja TATA, sitios S<sub>pl</sub> y/o NF-kappa B. Como resultado de las LTR 3' autoinactivantes, el provirus que se integra en el genoma de la célula hospedante comprenderá una LTR 5' inactivada.

30

**[0050]** Los vectores víricos proporcionados en el presente documento, comprenden típicamente un gen que codifica una proteína (u otra molécula, tal como ARNip) que es expresada convenientemente en una o más células diana. Preferiblemente, el gen de interés está situado entre las secuencias LTR 5' y LTR 3'. Además, el gen de interés preferiblemente está en una relación funcional con otros elementos genéticos, por ejemplo, secuencias reguladoras de la transcripción tales como promotores y/o potenciadores, para regular la expresión del gen de interés de una forma particular una vez que el gen se incorpora en la célula diana. En algunas realizaciones, las secuencias reguladoras de la transcripción útiles son aquellas altamente reguladas con respecto a la actividad, tanto

35

40

**[0051]** En algunas realizaciones, se pueden incorporar uno o más genes adicionales como una medida de seguridad, principalmente para permitir la muerte selectiva de células diana infectadas dentro de una población heterogénea, tal como dentro de un paciente humano. En una realización de ejemplo, el gen seleccionado es un gen de timidina quinasa (TK), cuya expresión hace a la célula diana susceptible a la acción del fármaco ganciclovir. En una realización adicional, el gen suicida es un gen suicida de caspasa 9.

45

**[0052]** En algunas realizaciones, se puede poner un gen que codifica una proteína marcadora antes o después del gen principal para la identificación de células que expresan la proteína deseada. Algunas realizaciones incorporan una proteína marcadora fluorescente, tal como la proteína verde fluorescente (GFP) o la proteína roja fluorescente (RFP), junto con el gen principal de interés. Si se incluyen uno o más genes indicadores adicionales, también se pueden incluir secuencias IRES o elementos 2A, separando el gen principal de interés de un gen indicador y/o cualquier otro gen de interés.

50

**[0053]** Algunas realizaciones pueden usar genes que codifican uno o más marcadores estables. Los ejemplos incluyen marcadores seleccionables que son eficaces en una célula eucariota o una célula procariota, tal como un gen para una resistencia a fármaco que codifica un factor necesario para la supervivencia o crecimiento de las células hospedantes transformadas en un medio de cultivo selectivo. Los genes de selección de ejemplo codifican proteínas que confieren resistencia a antibióticos y otras toxinas, p. ej., G418, higromicina B, puromicina,

55

zeocina, ouabaina, blasticidina, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, deficiencias auxotróficas del complemento, o puede haber suministro presente en un plásmido separado e introducirlo por cotransfección con el vector vírico.

5 **[0054]** Algunos vectores víricos tales como los vectores retrovíricos usan uno o más promotores heterólogos, potenciadores o ambos. En algunas realizaciones, la secuencia U3 de una LTR 5' retrovítica o lentivítica se puede sustituir por un promotor o potenciador en la construcción vírica. Algunas realizaciones usan un promotor/potenciador "interno" que está situado entre las secuencias LTR 5' y LTR 3' del vector vírico, y está operativamente unido al gen de interés. Una "relación funcional" y "operativamente unido" significa, sin limitación,  
10 que el gen está en la posición y orientación correctas con respecto al promotor y/o potenciador, de modo que se afectará la expresión del gen cuando el promotor y/o potenciador se pongan en contacto con las moléculas reguladoras adecuadas. Se puede usar cualquier combinación de potenciador/promotor que regule (p. ej., aumente, disminuya) la expresión del genoma de ARN vírico en la línea celular de empaquetamiento, regule la expresión del gen seleccionado de interés en una célula diana infectada, o ambos.

15 **[0055]** Un promotor es un elemento de control de la expresión formado por una secuencia de ADN que permite la unión de la ARN polimerasa y que tenga lugar la transcripción. Los promotores son secuencias no traducidas que están situadas en la dirección 5' del codón de inicio de un gen seleccionado de interés (típicamente en aproximadamente de 100 a 1000 pb) y controlan la transcripción y traducción de la secuencia de polinucleótido  
20 codificante a la que están operativamente unidos. Los promotores pueden ser inducibles o constitutivos. Los promotores inducibles inician niveles mayores de transcripción del ADN bajo su control en respuesta a algún cambio en condiciones de cultivo, tales como un cambio en la temperatura.

**[0056]** Se conocen una variedad de promotores en la técnica, así como procedimientos para unir  
25 operativamente el promotor a la secuencia codificante de polinucleótido. Se pueden usar tanto secuencias promotoras naturales como muchos promotores heterólogos para dirigir la expresión del gen seleccionado de interés. Algunas realizaciones usan promotores heterólogos, porque en general permiten una mayor transcripción y mayores rendimientos de la proteína deseada comparado con el promotor natural.

30 **[0057]** Algunas realizaciones pueden usar promotores víricos heterólogos. Los ejemplos de dichos promotores incluyen los obtenidos de genomas de virus tales como poliomavirus, virus de la viruela aviar, adenovirus, virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y virus simio 40 (SV40). Algunas realizaciones pueden usar promotor de mamífero heterólogo, tal como promotor de la actina, un promotor de inmunoglobulina, un promotor de choque térmico o un promotor que está asociado con la  
35 secuencia natural del gen de interés. Típicamente, el promotor es compatible con la célula diana, tal como un linfocito B quiescente, un linfocito B activado, un linfocito B plasmático, un linfocito B de memoria u otra célula diana linfocítica.

**[0058]** Algunas realizaciones pueden usar uno o más promotores de la ARN polimerasa I y III. Se puede  
40 encontrar una selección adecuada de promotores de la ARN polimerasa III, por ejemplo, en Paule and White. *Nucleic Acids Research.*, Vol. 28, pp 1283-1298, 2000, que se incorpora por referencia en su totalidad. Los promotores de la ARN polimerasa II y III también incluyen cualquier fragmento de ADN sintético o genéticamente manipulado que puede dirigir la ARN polimerasa II o III, respectivamente, para transcribir sus secuencias codificantes de ARN en la dirección 3'. Además, el promotor o promotores de la ARN polimerasa II o III (Pol II o III)  
45 usados como parte del vector vírico pueden ser inducibles. Se puede usar cualquier promotor de Pol II o III inducible adecuado con los procedimientos descritos en el presente documento. Los ejemplos de promotores de Pol II o III incluyen los promotores sensibles a tetraciclina proporcionados en Ohkawa and Taira, *Human Gene Therapy*, Vol. 11, pp 577-585, 2000; y Meissner et al., *Nucleic Acids Research*, Vol. 29, pp 1672-1682, 2001.

50 **[0059]** Los ejemplos no limitantes de promotores constitutivos que se pueden usar incluyen el promotor de la ubiquitina, el promotor del CMV (véase, p. ej., Karasuyama et al., *J. Exp. Med.* 169:13, 1989), de la  $\beta$ -actina (véase, p. ej., Gunning et al., *PNAS USA* 84:4831-4835, 1987), y el promotor de pgk (véase, p. ej., Adra et al., *Gene* 60:65-74, 1987); Singer-Sam et al., *Gene* 32:409-417, 1984; y Dobson et al., *Nucleic Acids Res.* 10:2635-2637, 1982).

55 **[0060]** Los ejemplos no limitantes de promotores específicos de tejido incluyen el promotor Ick (véase, p. ej., Garvin et al., *Mol. Cell Biol.* 8:3058-3064, 1988; y Takadera et al., *Mol. Cell Biol.* 9:2173-2180, 1989), el promotor de miogenina (Yee et al., *Genes and Development* 7:1277-1289, 1993), y el thy1 (véase, p. ej., Gundersen et al., *Gene* 113:207-214, 1992).

- [0061]** Los ejemplos adicionales de promotores incluyen el promotor de la ubiquitina C, el promotor de la cadena pesada  $\mu$  humana o el promotor de la cadena pesada de Ig (p. ej., MH-b12), y el promotor de la cadena ligera  $\kappa$  o el promotor de la cadena ligera de Ig (p. ej., EEK-b12) que son funcionales en linfocitos B. El promotor MH-b12 contiene el promotor de la cadena pesada  $\mu$  humana precedido por el potenciador  $iE_{\mu}$ , flanqueado por regiones de asociación de matriz, y el promotor EEK-b12 contiene el promotor de la cadena ligera  $\kappa$  precedido de un potenciador intrónico ( $iE_{\kappa}$ ), una región asociada a la matriz, y un potenciador 3' ( $3'E_{\kappa}$ ) (véase, p. ej., Luo et al., *Blood*. 113:1422-1431, 2009, y solicitud de patente de EE.UU. publicada 20100203630). Por consiguiente, algunas realizaciones pueden usar uno o más de estos elementos promotores o potenciadores.
- 10 **[0062]** Como se ha indicado antes, algunas realizaciones pueden usar elementos potenciadores, tales como un potenciador interno para aumentar la expresión del gen de interés. Los potenciadores son elementos de ADN que actúan en cis, normalmente de aproximadamente 10 a 300 pb de longitud, que actúan en un promotor para aumentar su transcripción. Algunas secuencias de potenciadores pueden derivar de genes de mamífero (p. ej., globina, elastasa, albúmina,  $\alpha$ -fetoproteína, insulina), tal como el potenciador  $iE_{\mu}$ , el potenciador intrónico  $iE_{\kappa}$  y el  
15 potenciador 3'  $E_{\kappa}$ . También están incluidos potenciadores de un virus eucariota, que incluye el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100-270), el promotor temprano del citomegalovirus, el potenciador del polioma en el lado tardío del origen de replicación y potenciadores adenovíricos. Los potenciadores se pueden empalmar en el vector en la posición 5' o 3' a la secuencia de polinucleótido específica del antígeno, pero preferiblemente se sitúan en un sitio 5' desde el promotor. Los expertos en la materia seleccionarán el potenciador  
20 adecuado basándose en el patrón de expresión deseado.
- [0063]** En algunas realizaciones, los promotores se pueden seleccionar para permitir la expresión inducible del gen. Se conocen en la técnica una serie de sistemas para la expresión inducible, que incluyen el sistema sensible a la tetraciclina y el sistema operador-represor lac. También está contemplado que se puede usar una  
25 combinación de promotores para obtener la expresión deseada del gen de interés. El experto en la materia podrá seleccionar un promotor basándose en el patrón de expresión deseado del gen en el organismo y/o célula diana de interés.
- [0064]** Algunos vectores víricos contienen secuencias de empaquetamiento que actúan en cis para promover  
30 la incorporación del ARN vírico genómico en la partícula vírica. Los ejemplos incluyen secuencias psi. Dichas secuencias que actúan en cis son conocidas en la materia.
- [0065]** En algunas realizaciones, los vectores víricos descritos en el presente documento pueden expresar dos o más genes, lo cual se puede llevar a cabo, por ejemplo, incorporando un promotor interno que está  
35 operativamente unido a cada gen separado más allá del primer gen, incorporando un elemento que facilita la co-expresión tal como una secuencia interna de entrada al ribosoma (IRES) (Patente de EE.UU. nº 4.397.190, incorporada por referencia) o un elemento 2A, o ambos.
- [0066]** Simplemente a modo de ilustración, los elementos IRES o 2A se pueden usar cuando un solo vector  
40 comprende secuencias que codifican cada cadena de una molécula de inmunoglobulina con una especificidad deseada. Por ejemplo, la primera región codificante (que codifica bien la cadena pesada o la ligera) puede estar ubicada inmediatamente en la dirección 3' desde el promotor, y la segunda región codificante (que codifica la otra cadena) puede ser ubicada en la dirección 3' desde la primera región codificante, con un elemento IRES o 2A  
45 ubicado entre la primera y la segunda región codificantes, preferiblemente precediendo inmediatamente a la segunda región codificante. En otra realización, un elemento IRES o 2A se usa para coexpresar un gen no relacionado, tal como un gen indicador, un marcador seleccionable o un gen que potencia la función inmunitaria.
- [0067]** Los ejemplos de secuencias de IRES que se pueden usar incluyen, sin limitación, los elementos IRES del virus de la encefalomiélitis (EMVC), virus de la fiebre aftosa (FMDV), virus de la encefalomiélitis murina de  
50 Theiler (TMEV), rinovirus humano (HRV), virus de Coxsackie (CSV), poliovirus (POLIO), virus de la hepatitis A (HAV), virus de la hepatitis C (HCV), y Pestivirus (p. ej., virus del cólera porcino (HOCV) y virus de la diarrea vírica bovina (BVDV)) (véase, p. ej., Le et al., *Virus Genes* 12:135-147, 1996; y Le et al., *Nuc. Acids Res.* 25:362-369, 1997).
- 55 **[0068]** Un ejemplo de un elemento 2A incluye la secuencia F2A del virus de la fiebre aftosa.
- [0069]** En algunas realizaciones, los vectores víricos proporcionados en el presente documento pueden contener también elementos genéticos adicionales para lograr un resultado deseado. Por ejemplo, algunos vectores víricos pueden incluir una señal que facilita la entrada nuclear del genoma vírico en la célula diana, tal como una

señal flap de VIH-1. Como ejemplo adicional, algunos vectores víricos pueden incluir elementos que facilitan la caracterización del sitio de integración del provirus en la célula diana, tal como una secuencia supresora de ARNt ámbar. Algunos vectores víricos pueden contener uno o más elementos genéticos diseñados para potenciar la expresión del gen de interés. Por ejemplo, se puede poner el elemento sensible al virus de la hepatitis de la marmota (WRE) en la construcción (véase, p. ej., Zufferey et al., *J. Virol.* 74:3668-3681, 1999; y Deglon et al., *Hum. Gene Ther.* 11:179-190, 2000).

**[0070]** Como otro ejemplo, también se puede incluir un aislante de globina  $\beta$  de pollo en la construcción vírica. Se ha mostrado que este elemento reduce la posibilidad de silenciar el provirus integrado en la célula diana debido a la metilación y efectos de heterocromatinización. Además, el aislante puede proteger el potenciador interno, promotor y gen exógeno de efectos de posición positivos o negativos del ADN que rodea en el sitio de integración en el cromosoma. Algunas realizaciones usan todos dichos elementos genéticos.

**[0071]** En algunas realizaciones, los vectores víricos (p. ej., retrovíricos, lentivíricos) proporcionados en el presente documento son "pseudotipados" con una o más glucoproteínas víricas seleccionadas o proteínas de envuelta, principalmente para dirigirse a tipos de células seleccionados. El pseudotipado se refiere en general, a la incorporación de una o más glucoproteínas víricas heterólogas en la partícula vírica en la superficie celular, a menudo permitiendo que la partícula vírica infecte una célula seleccionada que difiere de sus células diana normales. Un elemento "heterólogo" deriva de un virus distinto del virus del cual deriva el genoma de ARN del vector vírico. Típicamente, las regiones que codifican glucoproteínas del vector vírico se han alterado genéticamente, tal como por eliminación para prevenir la expresión de su propia glucoproteína. Simplemente a modo de ilustración, las glucoproteínas de la envuelta gp41 y/o gp120 de un vector lentivírico derivado de VIH, típicamente se eliminan antes del pseudotipado con una glucoproteína vírica heteróloga.

**[0072]** En algunas realizaciones, el vector vírico es pseudotipado con una glucoproteína vírica heteróloga que dirige a células plasmáticas tales como linfocitos B. En algunas realizaciones, la glucoproteína vírica permite la infección o transducción selectiva de linfocitos B en reposo o quiescentes. En algunas realizaciones, la glucoproteína vírica permite la infección selectiva de linfocitos B activados. En algunas realizaciones, la glucoproteína vírica permite la infección o transducción tanto de linfocitos B quiescentes como de linfocitos B activados. En algunas realizaciones, la glucoproteína vírica permite la infección de células de leucemia linfocítica crónica de linfocitos B. En algunas realizaciones, la glucoproteína vírica heteróloga se obtiene de la glucoproteína del virus del sarampión, tal como el virus del sarampión de Edmonton. En algunas realizaciones se realiza el pseudotipado de las glucoproteínas del virus del sarampión hemaglutinina (H) y proteína de fusión (F), o ambos (véase, p. ej., Frecha et al., *Blood.* 112:4843-52, 2008; y Frecha et al., *Blood.* 114:3173-80, 2009).

**[0073]** En realizaciones adicionales, el vector vírico comprende un dominio de unión a anticuerpo insertado, tal como una o más regiones variables (p. ej., regiones variables de la cadena pesada y ligera) que sirven para dirigir el vector a un tipo de célula particular.

**[0074]** La generación de vectores víricos se puede llevar a cabo usando cualquier técnica de ingeniería genética adecuada conocida en la materia, que incluye, sin limitación, las técnicas estándar de digestión con endonucleasas de restricción, ligado, transformación, purificación de plásmido, amplificación por PCR, secuenciación de ADN, por ejemplo, como describen Sambrook y col. (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y. (1989)), Coffin y col. (*Retroviruses.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y. (1997)) y "RNA Viruses: A Practical Approach" (Alan J. Cann, Ed., Oxford University Press, (2000)).

**[0075]** Se puede usar cualquiera de una variedad de procedimientos conocidos en la técnica para producir partículas retrovíricas adecuadas cuyo genoma comprende una copia de ARN del vector vírico. Como un procedimiento, el vector vírico se puede introducir en una línea celular de empaquetamiento que empaqueta el ARN genómico vírico basado en el vector vírico en partículas víricas con una especificidad de célula diana deseada. La línea celular de empaquetamiento típicamente proporciona las proteínas víricas en trans que son necesarias para el empaquetamiento del ARN genómico vírico en partículas víricas e infectar la célula diana, que incluye las proteínas gag estructurales, las proteínas pol enzimáticas, y las glucoproteínas de la envuelta.

**[0076]** En algunas realizaciones, la línea celular de empaquetamiento puede expresar establemente algunas proteínas víricas necesarias o deseadas (p. ej., gag, pol) (véase, p. ej., patente de EE.UU. n° 6.218.181). En algunas realizaciones, la línea celular de empaquetamiento se puede transfectar transitoriamente con plásmidos que codifican algunas de las proteínas víricas necesarias o deseadas (p. ej., gag, pol, glucoproteína), que incluyen las secuencias de glucoproteínas del virus del sarampión descritas en el presente documento, En una realización de

ejemplo, la línea celular de empaquetamiento expresa establemente las secuencias de gag y pol, y la línea celular después se transfecta con un plásmido que codifica el vector vírico y un plásmido que codifica la glucoproteína. Después de la introducción de los plásmidos deseados, las partículas víricas se recogen y procesan en consecuencia, tal como por ultracentrifugación para lograr una solución madre concentrada de partículas víricas. Las 5 líneas celulares de empaquetamiento incluyen las líneas celulares 293 (ATCC CCL X), HeLa (ATCC CCL 2), D17 (ATCC CCL 183), MDCK (ATCC CCL 34), BHK (ATCC CCL-10) y Cf2Th (ATCC CRL 1430).

Gen/ácido nucleico de interés

10 **[0077]** Como se usa en el presente documento “gen de interés” o “gen” o “ácido nucleico de interés” se refiere a un ácido nucleico de interés que codifica una proteína de interés que va a ser expresada en la célula transducida diana. Aunque se puede usar el término “gen” este no implica que sea un gen como se encuentra en el ADN genómico y se usa de forma intercambiable con el término “ácido nucleico”. En general, el ácido nucleico de interés proporciona ácido nucleico adecuado para codificar la proteína de interés y puede comprender ADNc o ADN 15 y puede incluir o no intrones, pero en general no incluye intrones. Como se indica en otra parte, el ácido nucleico de interés está operativamente unido a secuencias de control de la expresión para expresar eficazmente la proteína de interés en la célula diana. En algunas realizaciones, los vectores descritos en el presente documento pueden comprender dos o más genes de interés, y pueden incluir 2, 3 o 4 genes de interés, tales como, por ejemplo, las cadenas ligera y pesada de una inmunoglobulina que pueden estar organizados usando un promotor interno como 20 se describe en el presente documento.

**[0078]** La cita de “polinucleótido” o “ácido nucleico” como se usa en el presente documento indica ARNm, ARN, ARNc, ADNc o ADN. El término típicamente se refiere a la forma polimérica de nucleótidos de al menos 10 bases de longitud, sea ribonucleótidos o desoxinucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. 25 El término incluye formas mono y bicatenarias de ADN y ARN.

**[0079]** El ácido nucleico o gen de interés puede ser cualquier ácido nucleico que codifique una proteína de interés. Una proteína de interés para usar como se describe en el presente documento comprende cualquier proteína que proporcione la actividad deseada. En relación con esto, una proteína de interés incluye, pero no se 30 limita a un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, un receptor de superficie celular, una proteína secretada tal como una citoquina (linfoquinas, interleuquinas, interferones o quimioquinas), una molécula pequeña codificada por ADN (véase, p. ej., *Nature Chemical Biology* 5, 647 - 654 (2009)), o una molécula de adhesión.

**[0080]** En una realización, el ácido nucleico codifica un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo. Los fragmentos de unión al antígeno de ejemplo incluyen dominios de anticuerpos, sFv, scFv, Fab, Fab', 35 F(ab')<sub>2</sub>, Fv). En una realización, el anticuerpo codificado por el ácido nucleico comprende al menos el dominio de unión al antígeno del anticuerpo neutralizante del VIH, b12 (véase, p. ej., *J Virol* 2003, 77:5863-5876; *J Virol.* 1994 Aug; 68(8):4821-8; *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992, 89:9339-9343; se proporcionan secuencias de ejemplo con los números de acceso en GenBank para la cadena ligera b12 (AAB26306.1 GI 299737) y la cadena pesada 40 (AAB26315.1 GI 299746)). En una realización adicional, el anticuerpo codificado por el ácido nucleico de interés comprende Fuzeon™ (T-20 / enfuvirtida / pentafusida / DP-178). DP-178 es una secuencia de aminoácidos de gp14 del VIH e interfiere con la capacidad del VIH para fusionarse con su célula diana. Fuzeon se puede producir sintéticamente usando procedimientos conocidos para el experto en la materia (véase, p. ej., 2001 *J. Virol.* 75:3038-3042; debe indicarse que es muy improbable que los procedimientos descritos en este artículo produzcan la 45 secreción de una dosis terapéutica del péptido DP-178).

**[0081]** En una realización particular, el ácido nucleico de interés codifica una proteína inmunológicamente activa. En algunas realizaciones, un ácido nucleico de interés codifica una proteína, o un fragmento biológicamente activo de la misma, que induce una reacción inmunitaria similar a vacuna por la presentación de la proteína en la 50 superficie del linfocito B, linfocito T u otra célula inmunitaria. En algunas realizaciones, la proteína de interés influye en la regulación de los linfocitos B, por ejemplo, pero no limitado a, promueve la división celular, promueve la diferenciación en linajes B diferentes, inactiva o mata células, o regula la producción o actividad de otros elementos de ADN introducidos. El experto en la técnica conoce las interleuquinas y hasta la fecha incluyen IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, 55 IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, secretado de la subunidad p28 de IL27, IL-28, IL-29, IL-30, IL-31, IL-32, IL-33, IL-34, e IL-35. Los interferones incluyen IFN-γ, IFN-α, IFN-β e IFN-ω. Las quimioquinas contempladas para usar en el presente documento incluyen quimioquinas de tipo C XCL1 y XCL2, quimioquinas de tipo C-C (que hasta la fecha incluyen CCL1-CCL28) y quimioquinas de tipo CXC (que hasta la fecha incluyen CXCL1-CXCL17). También están contemplados como gen de interés, miembros de la superfamilia del TNF (p. ej., TNF-α, ligando 4-1BB, factor de

activación de linfocitos B, ligando FAS, linfotóxina, OX40L RANKL, y TRAIL).

**[0082]** En algunas realizaciones, la proteína de interés induce tolerancia inmunológica. En relación con esto, la proteína de interés puede comprender una proteína de fusión de IgG-antígeno (véase, p. ej., *Cellular Immunology* 5 235(1), 2005, 12-20).

**[0083]** En una realización adicional, el o los genes de interés codifican uno o más factores que promueven la diferenciación del linfocito B en una célula que segrega anticuerpo y/o uno o más factores que promueven la longevidad de la célula que produce anticuerpos. Dichos factores incluyen, por ejemplo, Blimp-1, TRF4, factores antiapoptóticos como Bcl-xl o Bcl5, mutantes del receptor CD40 constitutivamente activos. Genes adicionales de interés codifican factores que promueven la expresión de moléculas de señalización en la dirección 3' tales como factores asociados con el receptor de TNF (TRAF). En relación con esto, la activación de células, supervivencia celular y funciones antiapoptóticas de la superfamilia de receptores de TNF, son mediadas principalmente por TRAF1-6 (véase, p. ej., R.H. Arch, et al., *Genes Dev.* 12 (1998), pp. 2821-2830). Los efectores en la dirección 3' de la señalización de TRAF incluyen factores de transcripción en la familia de NF- $\kappa$ B y AP-1 que a su vez pueden poner en marcha genes implicados en diferentes aspectos de las funciones celular e inmunitaria. Además, se ha mostrado que la activación de NF- $\kappa$ B y AP-1 proporciona protección a las células frente a la apoptosis a través de la transcripción de genes antiapoptóticos.

**[0084]** En una realización adicional, el o los ácidos nucleicos de interés codifican una o más de proteínas derivadas del virus de Epstein Barr (EBV). Las proteínas derivadas de EBV incluyen, pero no se limitan a, EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3, LMP-1, LMP-2, EBER, EBV-EA, EBV-MA, EBV-VCA y EBV-AN.

**[0085]** En una realización particular, el ácido nucleico de interés codifica un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo. En relación con esto, el anticuerpo puede ser un anticuerpo natural o un anticuerpo modificado por ingeniería genética recombinante adaptado. Está específicamente contemplado que proteínas de fusión que comprenden un anticuerpo o parte del mismo están codificadas por los vectores descritos en el presente documento.

**[0086]** En una realización, un anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con la presente descripción tiene una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo dirigido contra el VIH, tal como el anticuerpo dirigido contra el VIH m36 (véase, p. ej., *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008 Nov 4;105(44):17121-6), o una molécula de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 60%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo dirigido contra el VIH, tal como m36. En particular, están específicamente contempladas proteínas de fusión que comprenden m36 o derivados del mismo, tales como m36L2CD4Fc (véase, p. ej., *Antiviral Research* volume 88, Issue 1, October 2010, Pages 107-115).

**[0087]** En una realización adicional, el anticuerpo codificado por el transgén de la descripción, se une a un autoantígeno. En algunas realizaciones, el autoantígeno en relación con esto, está asociado con el desarrollo de la esclerosis múltiple o diabetes de tipo 1, incluyendo, pero no limitado a MBP, alfaB-cristalina, S100beta, proteína proteolípida (PLP), HSP105, isoforma epitelial del antígeno 1 del pénfigo ampolloso (BP) (BPAG1-e), lípidos, y glucoproteína mielínica de oligodendrocitos isoformas (MOG)-alfa y MOG-beta o cualquiera de una variedad de autoantígenos de células de los islotes (p. ej., sialoglucolípido, glutamato descarboxilasa, insulina, receptor de insulina, 38 kD, albúmina de suero bovino, transportador de glucosa, hsp 65, carboxipeptidasa H, 52 kD, ICA 12/ICA512, 150 kD, y RIN polar). Los anticuerpos contra estos autoantígenos son conocidos en la técnica y se pueden secuenciar y hacer de forma recombinante usando técnicas rutinarias (véase, p. ej., *J. Clin. Invest.* 107(5): 555-564 (2001)).

**[0088]** En una realización adicional, el anticuerpo se une a un antígeno asociado con cáncer. Los antígenos asociados con cáncer pueden derivar de una variedad de proteínas tumorales. Las proteínas tumorales ilustrativas útiles en la presente descripción incluyen, pero no se limitan a una cualquiera o más de p53, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A10, MAGE-A12, BAGE, DAM-6, -10, GAGE-1, -2, -8, GAGE-3, -4, -5, -6, -7B, NA88-A, NY-ESO-1, MART-1, MC1 R, Gp100, PSA, PSM, Tirosinasa, TRP-1, TRP-2, ART-4, CAMEL, CEA, Cyp-B, Her2/neu (p. ej., el anticuerpo puede derivar del mAb específico para Her2, Herceptin®), hTERT, hTRT, iCE, MUC1, MUC2, PRAME, P15, RU1, RU2, SART-1, SART-3, WT1, AFP,  $\beta$ -catenina/m, Caspasa-8/m, CEA, CDK-4/m, ELF2M, GnT-V, G250, HSP70-2M, HST-2, KIAA0205, MUM-1, MUM-2, MUM-3, Miosina/m, RAGE, SART-2, TRP-2/INT2, 707-AP, Anexina II, CDC27/m, TPI/mbc-abl, ETV6/AML, LDLR/FUT, Pml/RAR $\alpha$ , y TEL/AML1. Estas y otras proteínas tumorales son conocidas para el experto en la materia.

**[0089]** En realizaciones adicionales, el ácido nucleico de interés codifica un péptido u otro dominio de unión con un atributo funcional particular, tal como, pero no limitado a una actividad inhibidora, capacidad para inducir la muerte celular en células de cáncer o capacidad para ralentizar o inhibir la proliferación de células de cáncer. En relación con esto, en una realización, un péptido o dominio de unión codificado por el ácido nucleico de interés se puede unir a cualquiera de las proteínas diana descritas en el presente documento, tal como un antígeno asociado con cáncer como se ha descrito antes, CD4, HIV gp120 u otras proteínas víricas, ICAM-3, DC-SIGN (véase, p. ej., patente de EE.UU. 7.301.010). En algunas realizaciones, los péptidos pueden derivar de bacterias patógenas y no patógenas y plantas verdes. Se describen péptidos ilustrativos en las patentes de EE.UU. 7084105, 7301010, 7338766, 7381701, 7491394, 7511117, 7556810. En una realización, el ácido nucleico de interés codifica azurina-p28 (NSC745104) un inhibidor peptídico de la ubiquitinación de p53 (véase, p. ej., *Cancer Chemother Pharmacol* 2010, DOI 10.1007/s00280-010-1518-3; patente de EE.UU. 7.084.105). En una realización adicional, el ácido nucleico de interés codifica un factor conocido como grelina, que induce apetito y se puede usar para tratar a pacientes con cáncer (véase, p. ej., *Obes Facts*. 2010 3:285-92; *FASEB J.* 18 (3): 439-56). En otra realización, el ácido nucleico de interés codifica un péptido de unión que se une a, e inhibe la angiopoyetina 1 y 2 (véase, p. ej., AMG386, un fragmento Fc de un anticuerpo (pepticuerpo) usado para tratar el cáncer.

**[0090]** En algunas realizaciones, los antígenos tumorales se pueden identificar directamente de un individuo con cáncer. En relación con esto, se pueden llevar a cabo cribados usando una variedad de tecnologías conocidas. Por ejemplo, en una realización, se toma una biopsia de tumor de un paciente, se aísla el ARN de las células tumorales y se criba usando un chip de gen (por ejemplo, de Affymetrix, Santa Clara, CA) y se identifica un antígeno tumoral. Una vez se ha identificado el antígeno tumoral diana, entonces se puede clonar, expresar y purificar usando técnicas conocidas en la materia.

**[0091]** Un "anticuerpo", como se usa en el presente documento, incluye tanto anticuerpo policlonales como monoclonales; primatizado (p. ej., humanizado); murino; ratón-humano; ratón-primate; y quimérico; y puede ser una molécula intacta, un fragmento de la misma (tal como fragmentos scFv, Fv, Fd, Fab, Fab' y F(ab)<sub>2</sub>), o multímeros, o agregados de moléculas intactas y/o fragmentos; y pueden encontrarse en la naturaleza o ser producidos, p. ej., por inmunización, síntesis o ingeniería genética; un "fragmento de anticuerpo", como se usa en el presente documento, se refiere a fragmentos, derivados de o relacionados con un anticuerpo, que se une al antígeno y que en algunas realizaciones se puede derivatizar para presentar características estructurales que facilitan la eliminación y absorción, p. ej., por incorporación de restos de galactosa. Esto incluye, p. ej., F(ab), F(ab)<sub>2</sub>, scFv, región variable de la cadena ligera (V<sub>L</sub>), región variable de la cadena pesada (V<sub>H</sub>), y combinaciones de los mismos.

**[0092]** Las fuentes incluyen secuencias de genes de anticuerpos de diferentes especies (que se pueden formar como anticuerpos, sFvs, scFvs o Fabs, tal como en una biblioteca de fagos), que incluyen humana, camélida (de camellos, dromedarios o llamas; Hamers-Casterman et al. (1993) *Nature*, 363:446 y Nguyen et al. (1998) *J. Mol. Biol.*, 275:413), tiburón (Roux et al. (1998) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA)* 95:11804), pez (Nguyen et al. (2002) *Immunogenetics*, 54:39), roedor, aviar, ovino, secuencias que codifican bibliotecas o secuencias de péptidos aleatorias que codifican una diversidad modificada genéticamente de aminoácidos en regiones bucle de regiones armazón de no anticuerpos alternativos, tales como dominios de fibrinógeno (véase, p. ej., Weisel et al. (1985) *Science* 230:1388), dominios Kunitz (véase, p. ej., patente de EE.UU. N° 6.423.498), dominios de lipocalina (véase, p. ej., el documento WO 2006/095164), dominios de tipo V (véase, p. ej., publicación de solicitud de patente de EE.UU. N° 2007/0065431), dominios de lectina de tipo C (Zelensky and Gready (2005) *FEBS J.* 272:6179), mAb<sup>2</sup> o Fcab<sup>TM</sup> (véase, p. ej., publicación de solicitud de patente PCT N° WO 2007/098934; WO 2006/072620), o similares.

**[0093]** Los términos entendidos por los expertos en la materia como relacionados con la tecnología de anticuerpos tienen el significado que toman en la materia, salvo que se defina expresamente en el presente documento. Por ejemplo, los términos "V<sub>L</sub>" y "V<sub>H</sub>" se refieren a la región variable de unión derivada de una cadena ligera y pesada de anticuerpo, respectivamente. Las regiones variables de unión están formadas de subregiones discretas, bien definidas, conocidas como "regiones determinantes de la complementariedad" (CDR) y "regiones armazón" (FR). Los términos "C<sub>L</sub>" y "C<sub>H</sub>" se refieren a una "región constante de inmunoglobulina", es decir una región constante derivada de una cadena ligera o pesada de anticuerpo, respectivamente, entendiéndose que esta última región se puede dividir además en los dominios de región constante C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub>, C<sub>H3</sub> y C<sub>H4</sub>, dependiendo del isotipo de anticuerpo (IgA, IgD, IgE, IgG, IgM) del cual se ha obtenido la región. Una parte de los dominios de la región constante componen la región Fc (la región de "fragmento cristizable") que contiene dominios responsables de las funciones efectoras de una inmunoglobulina, tales como la ADCC (citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo), CDC (citotoxicidad dependiente del complemento), y fijación del complemento, unión a receptores de Fc, mayor semivida in vivo con respecto a un polipéptido que carece de una región Fc, unión a proteína A, y quizás incluso transferencia placentaria (véase, Capon et al. (1989) *Nature*, 337:525). Además, un polipéptido que contiene

una región Fc permite la dimerización o multimerización del polipéptido.

**[0094]** La estructura de dominios de inmunoglobulinas es susceptible de modificación genética, en cuanto que los dominios de unión al antígeno y los dominios que confieren funciones efectoras se pueden intercambiar entre clases y subclases de inmunoglobulina. La estructura y función de la inmunoglobulina se revisan, por ejemplo, en Harlow et al., Eds., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Chapter 14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1988). Se puede encontrar una extensa introducción, así como información detallada sobre todos los aspectos de la tecnología de anticuerpos recombinante en el libro de texto *Recombinant Antibodies* (John Wiley & Sons, NY, 1999). Se puede encontrar una completa colección de protocolos de laboratorio de modificación genética de anticuerpos detallados en R. Kontermann and S. Dübel, Eds., *The Antibody Engineering Lab Manual* (Springer Verlag, Heidelberg/New York, 2000). Se encuentran más protocolos relacionados disponibles en *Current Protocols in Immunology* (Agosto 2009) publicado por John Wiley & Sons, Inc., Boston, MA.

**[0095]** Por lo tanto, esta descripción proporciona polinucleótidos (polinucleótidos aislados o purificados o puros) que codifican las proteínas de interés de esta descripción para modificar genéticamente linfocitos B, vectores (que incluyen vectores de clonación y vectores de expresión) que comprenden dichos polinucleótidos y células (p. ej., células hospedantes) transformadas o transfectadas con un polinucleótido o vector de acuerdo con esta descripción.

**[0096]** En algunas realizaciones, está contemplado un polinucleótido (ADN o ARN) que codifica una proteína de interés de esta descripción. También están contemplados en el presente documento casetes de expresión que codifican proteínas de interés.

**[0097]** La presente descripción también se refiere a vectores que incluyen un polinucleótido de esta descripción y, en particular, a construcciones de expresión recombinantes. En una realización, esta descripción contempla un vector que comprende un polinucleótido que codifica una proteína de esta descripción, junto con otras secuencias de polinucleótido que producen o facilitan la transcripción, traducción y procesamiento de dichas secuencias que codifican proteínas.

**[0098]** Se describen vectores de clonación y expresión adecuados para usar con hospedantes procariontes y eucariotas, por ejemplo, en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor, NY, (1989). Los vectores de clonación/expresión de ejemplo incluyen vectores de clonación, vectores lanzadera y vectores de expresión, que se pueden basar en plásmidos, fagémidos, fásmidos, cósmidos, virus, cromosomas artificiales o cualquier ácido nucleico vehículo conocido en la materia adecuado para la amplificación, transferencia y/o expresión de un polinucleótido contenido en el mismo.

**[0099]** Como se usa en el presente documento, salvo que se describa otra cosa en relación con los vectores víricos, "vector" significa una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Los vectores de ejemplo incluyen plásmidos, cromosomas artificiales de levaduras, y genomas víricos. Algunos vectores se pueden replicar de forma autónoma en una célula hospedante, mientras que otros vectores se pueden integrar en el genoma de una célula hospedante y de esta forma son replicados con el genoma hospedante. Además, algunos vectores se denominan en el presente documento "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente, "vectores de expresión") que contienen secuencias de ácido nucleico que están operativamente unidos a una secuencia de control de la expresión y, por lo tanto, son capaces de dirigir la expresión de esas secuencias.

**[0100]** En algunas realizaciones, las construcciones de expresión derivan de vectores plasmídicos. Las construcciones ilustrativas incluyen vector pNASS modificado (Clontech, Palo Alto, CA), que tiene secuencias de ácidos nucleicos que codifican un gen de resistencia a la ampicilina, una señal de poliadenilación y un sitio de promotor T7; pDEF38 y pNEF38 (CMC ICOS Biologics, Inc.), que tienen un promotor de CHEF1; y pD18 (Lonza), que tiene un promotor de CMV. Otros vectores de expresión de mamífero adecuados son bien conocidos (véase, p. ej., Ausubel et al., 1995; Sambrook et al., véase antes; véanse también, p. ej., catálogos de Invitrogen, San Diego, CA; Novagen, Madison, WI; Pharmacia, Piscataway, NJ). Se pueden preparar construcciones útiles que incluyen una secuencia que codifica la dihidrofolato reductasa (DHFR) bajo control regulador adecuado, para promover niveles de producción potenciados de proteínas de fusión, cuyos niveles resultan de la amplificación de genes después de la aplicación de un agente de selección adecuado (p. ej. metotrexato).

**[0101]** En general, los vectores de expresión recombinantes incluirán orígenes de replicación y marcadores seleccionables que permiten la transformación de la célula hospedante, y un promotor derivado de un gen altamente expresado para dirigir la transcripción de una secuencia estructural en la dirección 3', como se ha descrito antes. Un

vector unido operativamente con un polinucleótido de acuerdo con esta descripción, da una construcción de clonación o expresión. Las construcciones de clonación/expresión de ejemplo contienen al menos un elemento de control de la expresión, p. ej., un promotor, operativamente unido a un polinucleótido de esta descripción. Están contemplados elementos de control de la expresión adicionales, tales como potenciadores, sitios de unión  
 5 específicos de factor, terminadores y sitios de unión al ribosoma, en los vectores y construcciones de clonación/expresión de acuerdo con esta descripción. La secuencia estructural heteróloga del polinucleótido de acuerdo con esta descripción se ensambla en la fase adecuada con secuencias de inicio y terminación de la traducción. Por lo tanto, por ejemplo, se pueden incluir ácidos nucleicos codificantes proporcionados en el presente documento, en una cualquiera de una variedad de construcciones de vectores de expresión como una construcción  
 10 de expresión recombinante para expresar dicha proteína en una célula hospedante.

**[0102]** La o las secuencias de ADN adecuadas se pueden insertar en un vector, por ejemplo, por una variedad de procedimientos. En general, se inserta una secuencia de ADN en un sitio o sitios de escisión de endonucleasa de restricción adecuado, por procedimientos conocidos en la técnica. Están contempladas las  
 15 técnicas estándar para la clonación, aislamiento de ADN, amplificación y purificación, para reacciones enzimáticas que implican ADN ligasa, ADN polimerasa, endonucleasas de restricción y similares, y diferentes técnicas de separación. Se describe una serie de técnicas estándar, por ejemplo, en Ausubel et al. (*Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publ. Assoc. Inc. & John Wiley & Sons, Inc., Boston, MA, 1993); Sambrook et al. (*Molecular Cloning*, Second Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY, 1989); Maniatis et al. (*Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY, 1982); Glover (Ed.) (*DNA Cloning* Vol. I and II, IRL Press, Oxford, UK, 1985); Hames and Higgins (Eds.) (*Nucleic Acid Hybridization*, IRL Press, Oxford, UK, 1985); y en otros sitios.

**[0103]** La secuencia de ADN en el vector de expresión está operativamente unida a al menos una secuencia de control de la expresión adecuada (p. ej., un promotor constitutivo o un promotor regulado) para dirigir la síntesis de mRNA. Los ejemplos representativos de dichas secuencias de control de la expresión incluyen promotores de células eucariotas o sus virus, como se ha descrito antes. Las regiones de promotores se pueden seleccionar de cualquier gen deseado usando vectores de CAT (cloranfenicol transferasa) u otros vectores con marcadores seleccionables. Los promotores de eucariotas incluyen el temprano inmediato de CMV, timidina quinasa de HSV,  
 30 temprano y tardío de SV40, LTR de retrovirus, y metalotioneína-I de ratón. La selección del vector y promotor adecuados se basará en el nivel de experiencia del experto, y se describe en el presente documento la preparación de algunas construcciones de expresión recombinantes particularmente preferidas que comprenden al menos un promotor o promotor regulado operativamente unido a un ácido nucleico que codifica una proteína o polipéptido de acuerdo con esta descripción.

**[0104]** Las variantes de los polinucleótidos de esta descripción también están contempladas. Los polinucleótidos variantes son al menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, y preferiblemente 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 99,9% idénticos a uno de los polinucleótidos de secuencia definida descritos en el presente documento, o que hibridan con uno o más de esos polinucleótidos de secuencia definida en condiciones de hibridación restrictiva  
 40 de cloruro sódico 0,015 M, citrato sódico 0,0015 M a aproximadamente 65-68°C, o cloruro sódico 0,015 M, citrato sódico 0,0015 M y formamida al 50% a aproximadamente 42°C. Las variantes de polinucleótidos retienen la capacidad de codificar un dominio de unión o proteína de fusión del mismo que tiene la funcionalidad descrita en el presente documento.

**[0105]** El término "restrictivo" se usa para referirse a condiciones que se entienden habitualmente en la técnica como restrictivas. La restricción de la hibridación está determinada principalmente por la temperatura, fuerza iónica y la concentración de los agentes desnaturizantes tales como formamida. Los ejemplos de condiciones restrictivas para la hibridación y lavado son cloruro sódico 0,015 M, citrato sódico 0,0015 M a aproximadamente 65-68°C o cloruro sódico 0,015 M, citrato sódico 0,0015 M y formamida al 50% a aproximadamente 42°C (véase,  
 50 Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989).

**[0106]** También se pueden usar condiciones más restrictivas (tales como temperatura mayor, fuerza iónica menor, más formamida, u otro agente desnaturizante); sin embargo, se afectará a la velocidad de hibridación. En casos en donde esté implicada la hibridación de desoxi oligonucleótidos, las condiciones de hibridación restrictivas de ejemplo adicionales incluyen lavado en 6x SSC, pirofosfato sódico al 0,05% a 37°C (para oligonucleótidos de 14 bases), 48°C (para oligonucleótidos de 17 bases), 55°C (para oligonucleótidos de 20 bases), y 60°C (para oligonucleótidos de 23 bases).

**[0107]** Un aspecto adicional de esta descripción proporciona una célula hospedante transformada con, o que contiene de otra forma, cualquiera de los polinucleótidos o vectores/construcciones de expresión de esta descripción. Los polinucleótidos o construcciones de clonación/expresión de esta descripción se introducen en células adecuadas usando cualquier procedimiento conocido en la técnica, que incluyen transformación, transfección y transducción. Las células hospedantes incluyen las células de un sujeto sometido a terapia celular ex vivo, que incluye, por ejemplo, terapia génica ex vivo. Las células hospedante eucariotas contempladas como un aspecto de esta descripción cuando alojan un polinucleótido, vector o proteína de acuerdo con esta descripción incluyen, además de las propias células de un sujeto (p. ej., las propias células de un paciente humano), células VERO, células HeLa, líneas de células de ovario de hámster chino (CHO) (incluyendo células CHO modificadas capaces de modificar el patrón de glucosilación de moléculas de unión multivalente expresadas, véase la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N° 2003/0115614), células COS (tales como COS-7), W138, BHK, HepG2, 3T3, RIN, MDCK, A549, PC12, K562, células HEK293, células HepG2, células N, células 3T3, células de *Spodoptera frugiperda* (p. ej., células Sf9), células de *Saccharomyces cerevisiae*, y cualquier otra célula eucariota conocida en la materia que es útil para expresar, y opcionalmente aislar, una proteína o péptido de acuerdo con esta descripción. También están contempladas células procariotas, que incluyen *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, un estreptomiceto o cualquier célula procariota conocida en la materia que es adecuada para expresar, y opcionalmente aislar, una proteína o péptido de acuerdo con esta descripción. En el aislamiento de la proteína o péptido de células procariotas, en particular, está contemplado que se pueden usar técnicas conocidas en la materia para la extracción de proteínas de cuerpos de inclusión. La selección de un hospedante adecuado está al alcance de los expertos en la materia a partir de las enseñanzas del presente documento. Están contempladas células hospedantes que glucosilan proteínas de fusión de esta descripción.

**[0108]** La expresión “célula hospedante recombinante” (o simplemente “célula hospedante”) se refiere a una célula que contiene un vector de expresión recombinante. Debe entenderse que dichas expresiones se pretende que se refieran no solo a la célula del sujeto particular sino también a la progenie de dicha célula. Debido a que se pueden producir algunas modificaciones en las generaciones sucesivas debido a mutación o influencias medioambientales, de hecho, dicha progenie puede no ser idéntica a la célula original, pero todavía están incluidas dentro del alcance de la expresión “célula hospedante” usada en el presente documento.

**[0109]** Las células hospedantes recombinantes se pueden cultivar en un medio nutriente convencional modificado según sea adecuado para la activación de promotores, selección de transformantes o amplificación de genes particulares. Las condiciones de cultivo para células hospedantes particulares seleccionadas para la expresión, tales como temperatura, pH y similares, serán fácilmente evidentes para el experto en la materia. También se pueden usar diferentes sistemas de cultivo de células de mamífero para expresar la proteína recombinante. Los ejemplos de sistemas de expresión de mamífero incluyen líneas COS-7 de fibroblastos de riñón de mono, descritos por Gluzman (1981) *Cell* 23:175, y otras líneas celulares capaces de expresar un vector compatible, por ejemplo, las líneas celulares C127, 3T3, CHO, HeLa y BHK. Los vectores de expresión de mamífero comprenderán un origen de replicación, un promotor adecuado y opcionalmente, un potenciador, y también cualesquiera sitios de unión al ribosoma necesarios, sitios de poliadenilación, sitios de empalme de donador y aceptor, secuencias de terminación transcripcional, y secuencias no transcritas flanqueadoras 5', por ejemplo como se describe en el presente documento, en relación con la preparación de construcciones de expresión de proteínas de unión multivalentes. Se pueden usar secuencias de ADN derivadas del empalme de SV40, y sitios de poliadenilación, para proporcionar elementos genéticos no transcritos requeridos. La introducción de la construcción en la célula hospedante se puede realizar por una variedad de procedimientos con los que estarán familiarizados los expertos en la materia, que incluyen la transfección con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, o electroporación (Davis et al. (1986) *Basic Methods in Molecular Biology*).

#### Composiciones y procedimientos de uso

**[0110]** En una realización, las composiciones celulares de la presente descripción comprenden una población de linfocitos B transducidos y activados/diferenciados, que expresan una proteína de interés descrita en el presente documento. En una realización, las composiciones comprenden linfocitos B transducidos que se han diferenciado en linfocitos B plasmáticos y expresan una o más proteínas de interés. Las poblaciones de células diana, tales como las poblaciones de linfocitos B transducidos y activados de la presente descripción se pueden administrar solos, o como una composición farmacéutica en combinación con diluyentes y/o con otros componentes tales como citoquinas o poblaciones celulares. Brevemente, las composiciones celulares de la presente descripción pueden comprender una población de linfocitos B transducidos y activados/diferenciados, que expresan una proteína de interés como se describe en el presente documento, en combinación con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéutica o fisiológicamente aceptables. Dichas composiciones pueden comprender tampones tales como solución salina

tamponada neutra, solución salina tamponada con fosfato, y similares; hidratos de carbono tales como glucosa, manosa, sacarosa o dextranos, manitol; polipéptidos o aminoácidos tales como glicina; antioxidantes; agentes de quelación, tales como EDTA o glutatión; adyuvantes (p. ej., hidróxido de aluminio); y conservantes. Las composiciones de la presente descripción se formulan preferiblemente para la administración intravenosa.

5

**[0111]** Las composiciones celulares de la presente descripción se pueden administrar de una forma adecuada para la enfermedad que se va a tratar (o prevenir). La cantidad y frecuencia de administración estarán determinadas por factores tales como el estado del paciente, y el tipo y gravedad de la enfermedad del paciente, aunque se pueden determinar dosis adecuadas mediante ensayos clínicos

10

**[0112]** Cuando se indica “una cantidad eficaz”, “una cantidad eficaz antitumoral”, “una cantidad eficaz que inhibe el tumor” o “una cantidad terapéutica”, la cantidad precisa de las composiciones de la presente descripción que se administra la puede determinar un médico considerando las diferencias individuales en edad, peso, tamaño tumoral, extensión de infección o metástasis, y estado del paciente (sujeto). En general se puede establecer que una composición celular que comprende los linfocitos B descritos en el presente documento se puede administrar con una dosis de  $10^4$  a  $10^7$  células/kg de peso corporal, preferiblemente de  $10^5$  a  $10^6$  células/kg de peso corporal, incluyendo todos los valores enteros dentro de estos intervalos. Las composiciones de linfocitos B se pueden administrar también múltiples veces con estas dosis. Las células se pueden administrar usando técnicas de infusión que son normalmente conocidas en inmunoterapia (véase, p. ej., Rosenberg et al., *New Eng. J. of Med.* 319:1676, 1988). La dosis óptima y la posología del tratamiento para un paciente particular lo puede determinar fácilmente un experto en medicina, mediante el seguimiento de los signos de enfermedad del paciente y ajustando el tratamiento en consecuencia.

15

20

**[0113]** Típicamente, en estudios de inmunoterapia adoptiva, se administran los linfocitos T específicos de antígeno de  $2 \times 10^9$  a  $2 \times 10^{11}$  células al paciente (Véase, p. ej., patente de EE.UU. N° 5.057.423). En algunos aspectos de la presente descripción, se pueden administrar cantidades inferiores de linfocitos B transducidos de la presente descripción, en el intervalo de  $10^6$ /kilogramo ( $10^6$ - $10^{11}$  por paciente). En algunas realizaciones, los linfocitos B se administran en una cantidad de  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^{10}$ ,  $2 \times 10^{10}$ ,  $1 \times 10^{11}$ ,  $5 \times 10^{11}$ , o  $1 \times 10^{12}$  linfocitos B. Las composiciones de linfocitos B se pueden administrar múltiples veces con dosis dentro de estos intervalos. Las células pueden ser autólogas o heterólogas para el paciente sometido a tratamiento. Si se desea, el tratamiento también puede incluir la administración de mitógenos (p. ej., PHA) o linfoquinas, citoquinas y/o quimioquinas (p. ej., GM-CSF, IL-4, IL-13, Flt3-L, RANTES, MIP1 $\alpha$ , etc.) como se describe en el presente documento para potenciar la inducción de una respuesta inmunitaria.

30

**[0114]** La administración de las composiciones presentes, se puede llevar a cabo en cualquier forma conveniente, que incluye por inhalación de aerosol, inyección, ingestión, transfusión, implante o trasplante. Las composiciones descritas en el presente documento se pueden administrar a un paciente por vía subcutánea, intradérmica, intratumoral, intranodal, intramedular, intramuscular, por inyección intravenosa (i.v.) o vía intraperitoneal. En una realización, las composiciones de linfocitos B de la presente descripción se administran a un paciente por inyección intradérmica o subcutánea. En otra realización, las composiciones de linfocitos B descritas en el presente documento se administran preferiblemente por inyección i.v. Las composiciones de linfocitos B se pueden inyectar directamente en un tumor, nódulo linfático o sitio de infección.

40

**[0115]** En otra realización más, la composición farmacéutica se puede suministrar en un sistema de liberación controlada. En una realización, se puede usar una bomba (véase, Langer, 1990, *Science* 249:1527-1533; Sefton 1987, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:201; Buchwald et al., 1980; *Surgery* 88:507; Saudek et al., 1989, *N. Engl. J. Med.* 321:574). En otra realización, se pueden usar materiales poliméricos (véase, *Medical Applications of Controlled Release*, 1974, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla.; *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, 1984, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York; Ranger and Peppas, 1983; *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61; véase también Levy et al., 1985, *Science* 228:190; During et al., 1989, *Ann. Neurol.* 25:351; Howard et al., 1989, *J. Neurosurg.* 71:105). En otra realización más, se puede colocar un sistema de liberación controlada cerca de la diana terapéutica, requiriendo así solo una fracción de la dosis sistémica (véase, p. ej., *Medical Applications of Controlled Release*, 1984, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla., vol. 2, pp. 115-138).

50

55

**[0116]** Las composiciones de linfocitos B de la presente descripción también se pueden administrar usando una serie de matrices. Las matrices se han usado durante unos años dentro del contexto de la ingeniería tisular (véase, p. ej., *Principles of Tissue Engineering* (Lanza, Langer, and Chick (eds.)), 1997). La presente descripción usa dichas matrices dentro del nuevo contexto de actuación como un órgano linfoide artificial para soportar y mantener

los linfocitos B. Por consiguiente, la presente descripción puede usar esas composiciones y formulaciones de matrices que han demostrado utilidad en la ingeniería tisular. Por consiguiente, el tipo de matriz que se puede usar en las composiciones, dispositivos y procedimientos de la descripción prácticamente no tiene límites y puede incluir tanto matrices biológicas como sintéticas. En un ejemplo particular, se usan las composiciones y dispositivos 5 expuestos en las patentes de EE.UU. N°: 5.980.889; 5.913.998; 5.902.745; 5.843.069; 5.787.900; o 5.626.561. Las matrices comprenden características habitualmente asociadas con ser biocompatible cuando se administran a un hospedante mamífero. Las matrices se pueden formar tanto de materiales naturales como sintéticos. Las matrices pueden ser no biodegradables en casos donde es conveniente dejar estructuras permanentes o estructuras retirables en el cuerpo de un animal, tal como un implante; o biodegradables. Las matrices pueden tener forma de 10 esponjas, implantes, tubos, almohadillas Telfa, fibras, fibras huecas, componentes liofilizados, geles, polvos, composiciones porosas, o nanopartículas. Además, las matrices se pueden diseñar para permitir la liberación sostenida de células sembradas o citoquinas producidas u otro agente activo. En algunas realizaciones, la matriz de la presente descripción es flexible y elástica, y se puede describir como una estructura semisólida que es permeable a sustancias tales como sales inorgánicas, fluidos acuosos y agentes gaseosos disueltos, incluyendo oxígeno.

15

**[0117]** En el presente documento se usa una matriz como un ejemplo de una sustancia biocompatible. Sin embargo, la presente descripción no está limitada a matrices, y por lo tanto, donde sea que aparezcan los términos matriz o matrices, debe entenderse que estos términos incluyen dispositivos y otras sustancias que permiten la retención celular o recorrido celular, son biocompatibles, y son capaces de permitir el recorrido de macromoléculas 20 directamente a través de la sustancia de modo que la propia sustancia es una membrana semipermeable, o usadas junto con una sustancia semipermeable particular.

**[0118]** En algunas realizaciones de la presente descripción, los linfocitos B transducidos y activados usando los procedimientos descritos en el presente documento, u otros procedimientos conocidos en la técnica, se 25 administran a un paciente junto con (p. ej., antes, simultáneamente o después) cualquier número de modalidades de tratamiento relevantes, que incluyen, pero no se limitan al tratamiento con agentes tales como agentes antiviricos, quimioterapia, radiación, agentes inmunosupresores, tales como ciclosporina, azatioprina, metotrexato, micofenolato, y FK506, anticuerpos y otros agentes inmunoblivos tales como CAMPATH, anticuerpos dirigidos contra CD3 u otras terapias con anticuerpos, citoxina, fludarabina, ciclosporina, FK506, rapamicina, ácido micofenólico, esteroides, 30 FR901228, citoquinas, y radiación. Estos fármacos inhiben la fosfatasa dependiente de calcio calcineurina (ciclosporina y FK506) o inhiben la quinasa p70S6 que es importante para la señalización inducida por factores de crecimiento (rapamicina). (Liu et al., *Cell* 66:807-815, 1991; Henderson et al., *Immun.* 73:316-321, 1991; Bierer et al., *Curr. Opin. Immun.* 5:763-773, 1993; Isoniemi (véase antes)). En una realización adicional, las composiciones celulares de la presente descripción se administran a un paciente junto con (p. ej., antes, simultáneamente o 35 después) trasplante de médula ósea, terapia ablativa de linfocitos T usando bien agentes quimioterapéuticos tales como fludarabina, terapia con radiación de haces externos (XRT), ciclofosfamida, o anticuerpos tales como OKT3 o CAMPATH. En una realización, las composiciones celulares de la presente descripción se administran después de terapia ablativa de linfocitos B, tal como agentes que reaccionan con CD20, p. ej. Rituxan®. Por ejemplo, en una realización, los sujetos se pueden someter a tratamiento estándar con una dosis alta de quimioterapia seguida de 40 trasplante de citoblastos de sangre periférica. En algunas realizaciones, después de trasplante los sujetos reciben una infusión de células inmunitarias expandidas de la presente descripción. En una realización adicional, las células expandidas se administran antes o después de cirugía.

**[0119]** La dosis de los tratamientos anteriores que se va a administrar a un paciente variará con la naturaleza 45 precisa de la afección que se va a tratar y el receptor del tratamiento. Se puede llevar a cabo el ajuste de la dosis para la administración humana de acuerdo con las prácticas aceptadas en la técnica.

**[0120]** Las composiciones de linfocitos B transducidos de la descripción, en particular linfocitos B 50 transducidos para expresar un anticuerpo particular de interés, se pueden usar en el tratamiento o prevención de diferentes enfermedades infecciosas, cánceres, enfermedades degenerativas y trastornos inmunológicos.

**[0121]** Las composiciones que comprenden los linfocitos B transducidos como se describen en el presente documento, se pueden usar en el tratamiento de cualquiera de una variedad de enfermedades infecciosas causadas por organismos infecciosos, tales como virus, bacterias, parásitos y hongos. Los organismos infecciosos pueden 55 comprender virus (p. ej., virus de ARN, virus de ADN, virus de inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la hepatitis A, B y C, virus del herpes simple (HSV), citomegalovirus (CMV) virus de Epstein-Barr (EBV), papilomavirus humano (HPV)), parásitos (p. ej., protozoos y metazoos patógenos tales como especies de *Plasmodia*, especies de *Leishmania*, especies de *Schistosoma*, especies de *Trypanosoma*), bacterias (p. ej., *Mycobacteria*, en particular, *M. tuberculosis*, *Salmonella*, *Streptococci*, *E. coli*, *Staphylococci*), hongos (p. ej., especies de *Candida*, especies de

*Aspergillus*), *Pneumocystis carinii*, y priones (los priones conocidos infectan animales para producir encefalopatía espongiiforme ovina, una enfermedad degenerativa, transmisible del sistema nervioso de ovejas y cabras, así como la encefalopatía espongiiforme bovina (BSE) o “enfermedad de las vacas locas”, y encefalopatía espongiiforme felina de gatos. Cuatro enfermedades de priones que se sabe que afectan a los seres humanos son (1) kuru, (2) enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD), (3) enfermedad de Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS), y (4) insomnio familiar letal (FFI)). Como se usa en el presente documento “prion” incluye todas las formas de priones que producen todas o cualquiera de estas enfermedades u otras en cualquier animal usado, y en particular seres humanos y animales de granja domesticados. Las enfermedades infecciosas ilustrativas incluyen, pero no se limitan a toxoplasmosis, histoplasmosis, CMV, EBV, coccidiomicosis, tuberculosis, VIH, y similares.

10 **[0122]** En algunas realizaciones, las composiciones de linfocitos B transducidos como se describen en el presente documento también se pueden usar para la prevención o tratamiento de una variedad de cánceres. En relación con esto, en algunas realizaciones, las composiciones que comprenden linfocitos B transducidos son útiles para prevenir o tratar el mieloma, linfoma no Hodgkin, enfermedad de Hodgkin, leucemia, plasmocitoma, sarcoma, 15 glioma, timoma, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de riñón, carcinoma de células renales, cáncer de útero, cáncer de páncreas, cáncer de esófago, cáncer de cerebro, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer testicular, cáncer gástrico, cáncer de esófago, mieloma múltiple, hepatoma, leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia mielógena aguda (LMA), leucemia mielógena crónica (LMC) y leucemia linfocítica crónica (LLC), u otros cánceres.

20 **[0123]** En una realización, los linfocitos B transducidos se pueden usar también en el tratamiento de enfermedades inmunológicas tales como el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), agammaglobulinemia, hipogammaglobulinemia, otras inmunodeficiencias, inmunosupresión y enfermedad de inmunodeficiencia combinada grave.

25 **[0124]** En una realización, los linfocitos B transducidos como se describen en el presente documento se pueden usar también en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias tales como, pero no limitadas a artritis reumatoide, esclerosis múltiple, diabetes insulino dependiente, enfermedad de Addison, enfermedad celíaca, síndrome de fatiga crónica, enfermedad inflamatoria intestinal, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, fibromialgia, 30 lupus eritematoso sistémico, psoriasis, síndrome de Sjogren, hipertiroidismo/enfermedad de Graves, hipotiroidismo/enfermedad de Hashimoto, diabetes insulino dependiente (tipo 1), miastenia gravis, endometriosis, esclerodermia, anemia perniciosa, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Wegener, glomerulonefritis, anemia aplásica, hemoglobinuria nocturna paroxística, síndrome mielodisplásico, púrpura trombocitopénica idiopática, anemia hemolítica autoinmune, síndrome de Evan, síndrome del inhibidor del factor VIII, vasculitis sistémica, 35 dermatomiositis, polimiositis y fiebre reumática.

**[0125]** Por lo tanto, en una realización, los procedimientos del presente documento incluyen procedimientos para tratar una enfermedad que comprende administrar a un sujeto o paciente que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de las composiciones que comprenden linfocitos B transducidos como se describe en el 40 presente documento, tratando así la enfermedad.

## EJEMPLOS

### EJEMPLO 1

45 TRANSDUCCIÓN Y CULTIVO DE LINFOCITOS B DERIVADOS DE PBMC PARA PRODUCIR PROTEINA DE INTERÉS

**[0126]** En este ejemplo, linfocitos B derivados de PBMC se transdujeron y cultivaron hasta producir con éxito 50 el anticuerpo neutralizante del VIH, b12, o GFP.

#### Procedimientos:

**[0127]** PBMC humanas se descongelaron en medio RPMI y se contaron usando un hemocitómetro. Se recogieron linfocitos B de un total de  $1,23 \times 10^7$  PBMC usando el kit de purificación de linfocitos B con selección negativa de linfocitos B Easy-Sep de acuerdo con los protocolos de los fabricantes. Después de purificación, las células se contaron, y se añadieron  $3,5 \times 10^5$  linfocitos B a dos pocillos en una placa de 24 pocillos, conteniendo cada pocillo 1,25 ml de medio. El medio consistía en: RPMI, IL-2 (10 ng/ml), IL-10 (100 ng/ml), CpG (2 micromolar), y con o sin PHA (4 microgramos/ml).

**[0128]** Además,  $4 \times 10^4$  células estromales MS5 adherentes de ratón que previamente se habían transducido establemente con el ligando CD40 (células bajas en MS40) y seleccionado las células que expresaban niveles bajos del ligando, se añadieron a cada uno de los pocillos y se dejó que se adhirieran a la placa de cultivo durante 24 horas antes de añadir los linfocitos B (en presencia de las citoquinas y RPMI).

**[0129]** Los linfocitos B se expusieron a estas condiciones durante 3 días.

**[0130]** Después de 3 días de cultivo, las células se separaron y se añadieron 1,6 microgramos de polibreno a cada uno de los cultivos de 1,25 ml que contenían los linfocitos B y se incubaron durante 3 horas, y se añadieron vectores lentivíricos pseudotipados con virus de sarampión de Edmonston, que codificaban bien el anticuerpo neutralizante del VIH b12 o la GFP (ambos bajo el control del promotor EEK; véase *Blood*, 12 February 2009, Vol. 113, No. 7, pp. 1422-1431 y solicitud de patente de EE.UU. publicada 20100203630) a los linfocitos B con una MDI de 30. En total, tanto para las condiciones con PHA como sin, se transdujeron un total de 2 pocillos de linfocitos B con b12 y 1 pocillo con GFP.

**[0131]** Cada pocillo contenía el medio más citoquinas, células bajas en MS40 y  $2,67 \times 10^4$  linfocitos B. Se añadieron citoquinas de nueva aportación cada 3 días y se hizo el seguimiento de las células usando microscopía de fluorescencia para ver la presencia de células positivas para GFP. 18 días después de transducción, se separaron 500 microlitros de medio de cultivo de las muestras de b12 y GFP y se ensayó la presencia de b12 usando un dispositivo (Luminex Corporation, Austin, TX) usando la unión a GP140 para medir la presencia de b12 y b12 purificado, para generar una curva patrón para la cuantificación. Los resultados del dispositivo Luminex apoyaban que el PHA no tenía impacto significativo en la producción de b12, pero se incluía en el protocolo para la precisión y los procedimientos de recuento.

#### **Resultados:**

**[0132]** Los resultados indicaban que las células transducidas producían como media 1,05 ng/ml de anticuerpo b12 (véase la figura 1). Además, la microscopía de fluorescencia mostró que los linfocitos B transducidos con GFP se modificaron para brillar verdes. Es importante indicar que el promotor usado para dirigir la expresión de GFP y b12 solo es activo en linfocitos B diferenciados. Por lo tanto, las células solo fluorescen después de convertirse en células plasmáticas. Por lo tanto, este experimento mostró tanto que los virus modificaban la célula correctamente y que el sistema de cultivo era capaz de diferenciar el linfocito B quiescente modificado en una célula plasmática.

**[0133]** Todos los intervalos numéricos usados en el presente documento incluyen explícitamente todos los valores enteros dentro del intervalo y está contemplada la selección de valores numéricos específicos dentro del intervalo dependiendo del uso particular. Además, los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no a modo de limitación.

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para expresar un ácido nucleico de interés en una célula plasmática, que comprende:
  - 5 transducir linfocitos B en reposo indiferenciados obtenidos de sangre periférica, con un vector retrovítico pseudotipado con glucoproteínas del virus del sarampión H y F, para obtener linfocitos B transducidos, en el que dicho vector retrovítico comprende el ácido nucleico de interés operativamente unido a un promotor heterólogo que es compatible con un linfocito B plasmático; y poner en contacto los linfocitos B transducidos con una composición
    - 10 que comprende CD40L en combinación con un factor de activación de linfocitos B que comprende uno o más de los factores seleccionados del grupo que consiste en IL- 2, IL-7, IL-10 y CpG, en condiciones suficientes para diferenciar los linfocitos B transducidos en células plasmáticas, de modo que al menos 10% de los linfocitos B transducidos son activados y diferenciados en células plasmáticas que expresen el ácido nucleico de interés.
  - 15 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el vector retrovítico es un vector lentivítico.
  3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que el vector lentivítico carece de genes accesorios de lentivirus.
  - 20 4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el ácido nucleico de interés comprende un ácido nucleico que codifica al menos una región V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> de inmunoglobulina, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, o una proteína de fusión que comprende un anticuerpo o una parte del mismo.
  - 25 5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que el anticuerpo es un anticuerpo dirigido contra el VIH, un anticuerpo dirigido contra el ARN, un anticuerpo que se une a un autoantígeno, o un anticuerpo que se une a un antígeno asociado con cáncer.
  6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el CD40L es soluble, se
    - 30 proporciona en una célula o una línea celular o se une a una placa de tejido tisular o una perla.
    7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el promotor es un promotor específico de linfocitos B.
    - 35 8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el promotor es un promotor EEK.
    9. Un procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que se transducen una pluralidad de linfocitos B con el vector retrovítico en condiciones suficientes para transducir al menos 20% de los
      - 40 linfocitos B; y
      - en el que la pluralidad de linfocitos B transducidos se ponen en contacto con la composición que comprende CD40L en combinación con un factor de activación de linfocito B que comprende uno o más de los factores seleccionados del grupo que consiste en IL- 2, IL-7, IL-10 y CpG, en condiciones suficientes para diferenciar los linfocitos B
        - 45 transducidos en células plasmáticas, o activar los linfocitos B transducidos, de modo que al menos 20% de los linfocitos B transducidos son activados y se diferencian en células plasmáticas que expresen el ácido nucleico de interés.
        10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que las células plasmáticas expresan uno o más
          - 50 marcadores de superficie celular seleccionados del grupo que consiste en CD38, CD138, CD78, receptor de interleuquina 6 y CD27<sup>alto</sup>.
          11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que los linfocitos B se ponen en contacto adicionalmente con un factor de activación de linfocitos B seleccionado del grupo que consiste en
            - 55 IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, IL-30, IL-31, IL-32, IL-33, IL-34 e IL-35, IFN-γ, IFN-α, IFN-β, IFN-ω, quimioquinas tipo C XCL1 y XCL2, quimioquinas tipo C-C, CCL1-CCL28 y quimioquinas tipo CXC, CXCL1-CXCL17, y miembros de la superfamilia del TNF, TNF-α, ligando 4-1BB, factor de activación de linfocitos B (BLyS), ligando FAS, linfotóxina, OX40L RANKL y TRAIL.

12. Un procedimiento para expresar un ácido nucleico de interés en una célula que, antes de transducción, se ha diferenciado de un linfocito B en una célula plasmática CD38+, CD78+, IL6R+, CD45-, que comprende:

5

poner en contacto un linfocito B en reposo indiferenciado obtenido de la sangre periférica con una composición que comprende CD40L en combinación con un factor de activación de linfocitos B para obtener un linfocito B activado, en el que el factor de activación de linfocitos B comprende uno o más de los factores seleccionados del grupo que consiste en IL- 2, IL-7, IL-10 y CpG, y en el que la etapa de poner en contacto tiene lugar en condiciones suficientes para activar el linfocito B de modo que se diferencie en una célula plasmática CD38+, CD78+, IL6R+, CD45-; y

10

transducir la célula plasmática CD38+, CD78+, IL6R+, CD45-, con un vector retrovívico pseudotipado con glucoproteínas del virus del sarampión H y F, para obtener una célula plasmática CD38+ diferenciada transducida, en el que dicho vector retrovívico comprende el ácido nucleico de interés operativamente unido a un promotor heterólogo que es compatible con una célula plasmática, de modo que la célula plasmática diferenciada transducida expresa el ácido nucleico de interés.

15

13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que el vector retrovívico es un vector lentivívico, opcionalmente en el que el vector lentivívico carece de genes accesorios de lentivirus.

20

Figura 1

