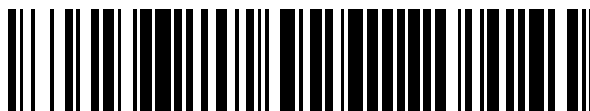


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 693 167**

51 Int. Cl.:

C12N 15/88 (2006.01)

C07K 14/005 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.11.2010 PCT/EP2010/067200**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.05.2011 WO11058052**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.11.2010 E 10779755 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.08.2018 EP 2498823**

54 Título: **Administración directa de proteínas con microvesículas modificadas por ingeniería**

30 Prioridad:

13.11.2009 EP 09306091

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.12.2018

73 Titular/es:

**INSERM - INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET
DE LA RECHERCHE MÉDICALE (100.0%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**MANGEOT, PHILIPPE y
LOTTEAU, VINCENT**

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 693 167 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

Administración directa de proteínas con microvesículas modificadas por ingeniería

5 **Sector de la técnica**

La presente divulgación se refiere a administración directa de proteínas con microvesículas modificadas por ingeniería.

10 **Estado de la técnica**

La introducción transitoria de proteínas de interés en una célula diana es un desafío principal, con muchas aplicaciones en investigación básica, ciencia aplicada y en el campo terapéutico.

15 Durante décadas, la introducción de una proteína de interés en una célula diana se ha conseguido indirectamente, mediante la introducción de material genético que codifica dicha proteína de interés, conocido como transfección.

Durante años se han desarrollado muchas técnicas de transfección, tales como transfección con fosfato cálcico, electroporación y lipofección.

20 Sin embargo, estas técnicas tienen varios inconvenientes que pueden limitar su uso. La introducción de un gen que codifica una proteína de interés en una célula diana depende de la maquinaria de transcripción y traducción de la célula diana. La expresión de la proteína deseada es por lo tanto lenta, y se pueden observar varios efectos no deseados (toxicidad del propio reactivo de transfección, activación de la respuesta al interferón, etc.).

25 Además, ciertos tipos de células, generalmente células que no se dividen tales como neuronas, se pueden transfectar escasamente. Para evitar este inconveniente más recientemente se han desarrollado otras técnicas de transferencia genética conocidas como transducción. La transducción depende del uso de un vector viral para transferir material genético a una célula diana. Para este efecto a menudo se usan sistemas basados en retrovirus. Sin embargo, estas tecnologías adolecen de varios inconvenientes. En primer lugar, existe un riesgo sanitario asociado con el uso de vectores retrovirales, aunque dichos vectores retrovirales hayan sido inactivados. En segundo lugar, la producción de partículas retrovirales es muy tediosa y consume mucho tiempo. De hecho, implica la producción de grandes cantidades de 4 o 5 plásmidos diferentes que codifican las diversas proteínas necesarias para la formación de las partículas del vector viral. Por último, los efectos observados en la célula diana no son inmediatos. Por lo general, la proteína de interés se expresa en la célula objetivo después de un retraso de al menos 35 24 horas, normalmente de 48 a 72 horas, durante la cual se realizan la transcripción y la traducción.

40 Los trabajos anteriores describieron la transferencia inesperada de proteínas indicadoras mediante agentes testigo coproducidos con vectores retrovirales (Liu *et al.*, Journal of virology 70, 2497-2502 (1996); Gallardo *et al.*, Blood 90, 952-957 (1997). Por ejemplo, estos autores describieron la capacidad de su preparación viral para administrar β -Galactosidasa en células diana que se sabe que no son permisivas para transferencia genética mediada por retrovirus. Este artefacto de transducción indeseable denominado pseudotransducción condujo a una expresión transitoria de la proteína transferida en la célula tratada, mientras que la transducción retroviral asegura una expresión estable a largo plazo del transgén administrado. De forma interesante estos autores usaron vectores 45 retrovirales pseudotipados con la proteína G del Virus de la Estomatitis Vesicular (VSV-G) y observaron que la pseudotransducción se producía específicamente con partículas retrovirales revestidas con VSV-G concentrado. Sin embargo, estos estudios no proporcionaron evidencias concluyentes del mecanismo subyacente a esta pseudotransducción mediada por proteína y se pensó que la proteína transferida estaba integrada de la manera más probable en la envoltura viral (Schnell *et al.*, PNAS, 1996, 93, 11359-11365). Por lo tanto, se pensaba que esta 50 pseudotransducción se limitaba a las proteínas de membrana. Además, se creía que no se podía disociar a partir de transducción retroviral mediada por genes.

Para obtener una administración específica, controlada por el tiempo de una proteína de interés en una célula diana, otra técnica disponible es la microinyección en la célula diana. Sin embargo, esta técnica requiere la obtención de la 55 proteína de interés antes de la microinyección. Los péptidos se pueden obtener por síntesis química, mientras que las proteínas más grandes requerirán procedimientos específicos de producción y purificación. Por lo tanto, estos métodos son de coste elevado y son poco adecuados para usos a gran escala.

Otros estudios se han centrado en el suministro de proteínas mediante su conjugación con un péptido corto que 60 media la transducción de proteínas, tal como el VIH tat y poliarginina. Sin embargo, estas técnicas también son difíciles de desarrollar a gran escala, ya que dependen de proteínas recombinantes.

Por lo tanto, en la técnica todavía existe una necesidad de un método rápido, seguro y eficaz para administrar una 65 proteína de interés en una célula diana.

Objeto de la invención

La invención se define en las reivindicaciones.

5 La presente divulgación se refiere a una célula eucariota que sobreexpresa una proteína de fusión de la membrana viral y una proteína de interés.

La presente divulgación también se refiere a una microvesícula secretada por una célula eucariota de acuerdo con la divulgación, en la que dicha microvesícula comprende dicha proteína de fusión de la membrana viral y dicha
10 proteína de interés.

La presente divulgación también se refiere a un método *in vitro* para administrar una proteína de interés en una célula diana poniendo en contacto dicha célula diana con una microvesícula de acuerdo con la divulgación que comprende dicha proteína de interés.
15

Descripción detallada de la invención

Los inventores han descubierto que la sobreexpresión de una proteína de fusión de la membrana viral en una célula eucariota que expresa una proteína de interés puede conducir a la secreción de microvesículas que comprenden
20 dicha proteína de fusión de membrana y dicha proteína de interés. Además, los inventores han demostrado que dichas microvesículas se pueden usar para administrar dicha proteína de interés de forma eficaz a una célula diana, sin alterar la función de dicha proteína. Por lo tanto el método de la presente divulgación es adecuado para una introducción transitoria y rápida de una proteína funcional en una célula diana.

25 Por lo tanto, la presente divulgación se refiere a una célula eucariota que sobreexpresa una proteína de fusión de la membrana viral y una proteína de interés. Dicha célula eucariota es capaz de secretar microvesículas que comprenden dicha proteína de fusión de la membrana viral y dicha proteína de interés.

En una realización, la célula eucariota de acuerdo con la divulgación no expresa ninguna proteína estructural viral y las microvesículas secretadas por las células eucariotas de ese tipo no comprenden ninguna proteína estructural
30 viral. Por consiguiente, las microvesículas de acuerdo con la divulgación se diferencian en ese aspecto de las partículas similares a virus (VLP) que se describen en la técnica, por ejemplo, en el documento WO2006/059141, dichas VLP comprenden proteínas estructurales virales, tales como VIH1 Gag.

35 Como se usa en el presente documento, la expresión "proteína estructural viral" se refiere a proteínas virales que contribuyen a la estructura general de la proteína de la cápside o del núcleo proteico de un virus. La expresión "proteína estructural viral" incluye fragmentos o derivados funcionales de tal proteína viral que contribuyen a la estructura de una proteína de la cápside o del núcleo proteico de un virus. Un ejemplo de proteína estructural viral es VIH1 Gag. Las proteínas de fusión de la membrana viral no se consideran proteínas estructurales virales. Por lo
40 general, dichas proteínas estructurales virales se localizan dentro de las microvesículas.

De hecho los inventores han mostrado que las microvesículas que comprenden una proteína de interés se pueden producir en células eucariotas que no expresa ninguna proteína estructural viral pero que sobreexpresan una proteína de fusión de membrana, tal como VSV-G u otras proteínas fusogénicas, y dicha proteína de interés.
45

Además, las microvesículas de acuerdo con la divulgación pueden no contener ningún ácido nucleico que codifique la proteína de interés. Por supuesto, no se puede excluir que en dichas microvesículas están contenidas trazas de ácidos nucleicos, en particular trazas de ARNm de células productoras o incluso ADN que resulta de la transfección
50 previa. Sin embargo, los inventores han demostrado que las trazas de ácidos nucleicos de ese tipo (si existen) no pueden ser responsables de al menos un 90 % de la transferencia de la función de la proteína por microvesículas.

Por lo general la célula eucariota es una célula de mamífero, tal como una célula humana, una célula de pollo o una célula de insecto. Los ejemplos de células de mamífero adecuadas son, pero no se limitan a células HEK-293T, células COS7, células Hela y células HEK-293. Los ejemplos de células de insecto adecuadas incluyen, pero no se
55 limitan a, células High5 y células Sf9. Las células de insecto presentan varias ventajas. En particular, están desprovistas de proteína humana indeseable, y su cultivo no requiere suero animal.

Por "sobreexpresión", se hace referencia a cualquier medio conocido en la técnica para aumentar la cantidad de proteína expresada por una célula dada. De manera práctica, la proteína de fusión de la membrana viral y la
60 proteína de interés se expresan en dichas células eucariota hasta un nivel de modo que dichas células eucariotas son capaces de secretar microvesículas que comprenden dicha proteína de fusión de la membrana viral y dicha proteína de interés sin la necesidad de expresar ninguna proteína estructural viral.

Por lo general, la sobreexpresión de la proteína de fusión de la membrana viral y de la proteína de interés se puede conseguir transfectando la célula eucariota con un vector de expresión que codifica la proteína de fusión de la
65 membrana viral y un vector de expresión que codifica la proteína de interés.

En otra realización, dicha célula eucariota de acuerdo con la divulgación está sobreexpresando VSV-G como una proteína de fusión de la membrana viral y una proteína de interés pero no sobre expresa ninguna otra proteína viral, en particular ninguna proteína estructural viral. De las microvesícula secretadas de acuerdo con dicha realización comprende VSV-G y dicha proteína de interés pero no comprenden ninguna proteína estructural viral.

5 En otra realización específica, las células eucariotas sobre expresa no solamente la proteína de fusión de la membrana viral y dicha proteína de interés. En esta realización, la expresión de la proteína de fusión de la membrana viral, por ejemplo VSV-G, puede representar al menos 30 %, por ejemplo al menos un 50 %, de las proteínas sobreexpresadas en las células.

10 En una realización, dicha proteína de fusión de la membrana viral y dicha proteína de interés se pueden codificar mediante dos vectores diferentes.

15 En una realización, de fusión de la membrana viral y dicha proteína de interés pueden ser cortadas por un solo lector que contiene un casete de expresión bicistrónico. En una realización relacionada; dicha proteína de fusión de la membrana viral y dicha proteína de interés no se unen en conjunto mediante enlace covalente.

20 En una realización, los vectores de expresión pueden incluir plásmidos de replicación episómica y, por ejemplo, plásmidos que comprenden secuencia de origen de naturaleza viral tales como secuencias de ORI de SV40 u ORI de EBV.

25 La sobreexpresión a través de vectores de expresión puede comprender cualquier método de transferencia genética conocido en la técnica de biología molecular. En una realización preferente, la sobreexpresión se obtiene por transfección de un ADN exógeno. Los métodos de transfección adecuados son métodos clásicos conocidos por la persona con experiencia, tales como transfección con fosfato cálcico, transfección usando liposomas (también conocida como lipofección) o electroporación. Dentro de la capacidad de la persona con experiencia está seleccionar el método de transfección apropiado para una célula dada.

30 En una realización preferente, la sobreexpresión no se obtiene mediante transducción viral.

La sobreexpresión puede ser sobreexpresión transitoria o sobreexpresión estable.

35 Cuando se usa sobre expresión transitoria, las células por lo general sobre expresan cantidades óptimas de la proteína de fusión de la membrana viral y/o la proteína de interés entre 48 y 72 horas después de a transfección.

40 El término "sobreexpresión" también abarca la sobreexpresión de una proteína endógena, es decir, una proteína que se expresa de forma natural por la célula eucariota. La sobreexpresión puede consistir ya sea en la introducción de copias adicionales del gen que codifica dicha proteína o en la estimulación de la expresión de la proteína endógena. A modo de ejemplo, la célula eucariota se puede colocar en condiciones de cultivo conocidas por que aumentan la expresión de dicha proteína endógena.

En una realización de la divulgación, la célula eucariota sobreexpresa de 2 a 5 proteínas de interés diferentes.

45 Por lo general, dicha proteína de fusión de la membrana viral es una proteína de fusión de la membrana viral de clase I tal como la hemaglutinina del virus de la gripe, una proteína de fusión de la membrana viral de clase II o una proteína de fusión de la membrana viral de clase III (para revisión sobre proteína de fusión de la membrana viral de clase III véase Backovic *et al.*, Curr Opin Struct Biol 2009, 19 (2): 189-96 o Courtney *et al.*, Virology Journal 2008, 5: 28).

50 En una realización preferente, dicha proteína de fusión de la membrana viral es una proteína de fusión de la membrana viral de clase I.

55 Los ejemplos de proteínas de fusión de la membrana viral de clase I son proteínas de Baculovirus F, en particular proteínas F de los géneros de nucleopolihedrovirus (NPV), tales como proteína F de MNPV de *Spodoptera exigua* (SeMNPV) y proteína F de MNPV de *Lymantria dispar* (LdMNPV).

En una realización preferente dicha proteína de fusión de la membrana viral es una proteína de fusión de la membrana viral de clase III.

60 Los ejemplos de proteínas de fusión de la membrana viral de clase III son rabdovirus G (tal como la proteína G fusogénica del Virus de la Estomatitis Vesicular (VSV-G)), gB del virus del herpes (tal como la glicoproteína B del virus 1 del Herpes Simplex (VHS-1 gB)), gB de EBV, gp64 de togotovirus G, baculovirus (tal como gp64 de NPV múltiple de *Autographa California* (Ac-MNPV)), y la glicoproteína (BDV G) del virus de la enfermedad de Borna (BDV).

65 En una realización más preferente, dicha proteína de fusión de la membrana viral es VSV-G o gp64 de baculovirus.

En una realización, dicha proteína de fusión de la membrana viral es polipéptido de VSV-G como se define en GenBank AN: M35219.1, o cualquier fragmento funcional o sus derivados funcionales que retienen propiedades fusogénicas.

5 Como se usa en el presente documento, el término "fusogénico" se refiere a una proteína viral que puede inducir la fusión de la membrana plasmática de las microvesículas a la membrana de la célula diana.

10 En una realización de la divulgación, láser eucariota de acuerdo con la divulgación sobre expresa adicionalmente una proteína que induce gemación de la membrana. En esta realización, la producción de microvesículas se potencia.

Como se usa en el presente documento, la expresión "proteína que induce gemación de la membrana" se refiere a cualquier proteína que pueda estimular la deformación de las bicapas lipídicas y median la formación de vesículas.

15 La capacidad de una proteína de ensayo dada para inducir gemación de la membrana se puede evaluar de acuerdo con el siguiente ensayo "A" *in vitro*: las células HEK293T se transfectan con la proteína de ensayo o se transfectan de forma simulada con un vector vacío. 20 horas después de a transfección, los medios celulares se reemplazan con medio que contiene R18 (20 μ g/ml). R18, o cloruro de octadecil rodamina B, es un compuesto lipófilo que se unían membranas y emite fluorescencia a 590 nm después de excitación a 560 nm. Después de 6 horas de incubación,
20 para permitir la incorporación de R18 en membranas celulares, los medios se cambian por medio recién preparado sin R18. 72 horas después de la transfección, los medios de las células transfectadas y de las células transfectadas de forma simulada se recogen, se aclaran y se analizan con un fluorómetro. La cantidad de fluorescencia asociada a R18, normalizada con respecto al número de células vivas de las que se hace el recuento con un ensayo a base de rezazurina, refleja la cantidad de membrana liberada por las células en cada condición.

25 Se considera que una proteína de ensayo induce gemación de la membrana si aumenta la cantidad de fluorescencia asociada a R18 por célula, tal como se mide con el ensayo "A" que se ha mencionado anteriormente.

Se sabe que diversas proteínas celulares y virales inducen gemación de la membrana.

30 Los ejemplos de proteínas celulares que inducen gemación de la membrana son la proteína PLP1 proteolipídica (Trajkovic *et al.*, 2008 Science, vol 319, p 1244-1247), el complejo API adaptador de clatrina (Camus *et al.*, 2007. Mol Biol Cell vol 18, p3193-3203), proteínas que modifican las propiedades lipídicas tales como flopasa, escramblasa, proteínas que facilitan la secreción a través de una ruta no clásica tal como TSAP6 (Yu *et al.*, 2006 Cancer Res vol 66, p4795-4801) y CHMP4C (Yu *et al.*, 2009, FEBS J. vol 276, p2201-2212).

40 Los ejemplos de proteínas virales que inducen gemación de la membrana son antagonistas de teterina/CD317 tales como la proteína Vpu del VIH (Neil *et al.*, 2008. Nature vol 451, p425-4431) y diversas proteínas estructurales viral tales como GAG retroviral (Camus *et al.*, 2007. Mol Biol Cell vol 18, p3193-3203) y VP40 del Ébola (Timmins *et al.*, Virology 2001).

La gemación de la membrana también se puede inducir modificando las condiciones de cultivo celular de la célula eucariota que sobreexpresa una proteína de fusión de la membrana viral y una proteína de interés, tales como temperatura, concentración de Ca²⁺, etc.

45 Como se usa en el presente documento, dicha proteína de interés puede ser cualquier protein o polipéptido que se desea transfectar a las células diana. En una realización, dicha proteína de interés no comprende ninguna proteína de fusión de la membrana viral o ningún fragmento de dicha proteína de fusión de la membrana viral o derivados que mantienen las propiedades fusogénicas.

50 Generalmente dicha proteína de interés puede ser una proteína heteróloga, por ejemplo, una proteína de membrana, una proteína citoplasmática, una proteína viral o una proteína nuclear. Como se usa en el presente documento, el término "heteróloga" se refiere que dicha proteína no se expresa a partir de un gen que se encuentra de forma natural en el genoma de las células eucariotas que sobre expresa en dicha proteína de interés.

55 Como alternativa, dicha proteína de interés puede ser una proteína endógena, por ejemplo, una proteína que se expresa de forma natural en cantidades elevadas en ciertas líneas celulares. En esta realización, las líneas celulares que expresan de forma natural una proteína de interés en cantidades elevadas se modifican con ingeniería genética para sobreexpresar adicionalmente la proteína de fusión de membrana, tal como sobreexpresar adicionalmente la
60 proteína de fusión de membrana, tal como VSV-G, con el fin de producir microvesículas que contienen dicha proteína de interés y dicha proteína de fusión de membrana.

65 Los ejemplos de proteínas de membrana adecuadas son receptores de membrana, CD81, mCAT-1 (receptor Ecotrópico), CXCR4 y proteínas de asentamiento, CD4, CCR5, proteínas ricas en ácido siálico, claudinas, CD21, receptores de linfocitos T, receptores de linfocitos B, CFTR y TNFR1.

Los ejemplos de proteínas citoplasmáticas adecuadas son factores apoptóticos tales como BAX, BID, BAK, BAD, FasL y proteínas fluorescentes tales como GFP, YPF, Venus, CFP, DsRojo, Rojo-Cereza y DsRed 2.

5 Los ejemplos de proteínas virales son tat, rev, gp120, GP41 (VIH-1/2, VIS), vpx (VIS), tax, rex (HTLV-1), EB1, EBNA2, EBNA1, BHRF1 (EBV), NS3, NS5A, NS1, NS2, Core, E1, E2 (VCH), T pequeños, antígeno de T grande (SV40), NS1, Neuraminidasa y HA (Gripe).

10 Los ejemplos de proteínas nucleares son factores o cofactores de transcripción, el transactivador de tetraciclina tTA, VP16 y proteínas de fusión que contienen VP16, la CRE recombinasa, Cre-Ert2 recombinasa, FLP recombinasa o flipasa, Hin recombinasa, RecA/RAD51, Tre recombinasa, meganucleasas tales como I-Sce1, factores de transcripción tales como GATA-1, FOG, NF-E2, TAL1/SCL, EKLF, FBI-1, RUNX1, PU.1, Receptor de ácido Retinoico, receptor de vitamina B3, proteínas de unión a CCAAT/potenciador, Ikaros, Pax5, Janus Quinasa, E2A, Bcl-6, familia de EBF, Egr 2 y 3, KIF5, Tcf4, MyoD, SUM-1, miogenina, myf-5, MRF4, Pitx2, Egr 2 y Egr 3, NFkB, API, AP2, factores de POU, Sp1/Sp3, bHLH, Engrailed 2, Foxg1, ELF3, Erm, Olf-1, Pax6, alfa-Pal/Nrf-1, Nurr1 y Pitx3.

20 De forma ventajosa, los inventores han mostrado que la proteína de interés detiene su funcionalidad una vez que se ha transferido en la célula diana. En particular, dicha proteína de interés no se escinde en las diana. Por ejemplo, dicho receptor de membrana se localiza de forma correcta en la membrana celular después de su administración por microvesículas con el fin de ser capaz de reconocer su correspondiente ligando. En otra realización, dicha proteína de interés es un factor de transcripción o correspondiente que se localiza de forma correcta en el núcleo después de su administración por microvesículas con el fin de estimular o reprimir La transcripción de genes regulados por dicho factor de transcripción.

25 En una realización de la divulgación, la proteína de interés se puede modificar para su localización en la membrana de la célula.

30 En una realización la proteína de interés no está fusionada con la proteína de fusión de la membrana viral. De forma ventajosa la proteína de interés se puede modificar adicionalmente con el fin de ser liberada desde la membrana en una condición ácida mediante introducción de un sitio de escisión proteolítica que se puede escindir en condiciones ácidas. Los ejemplos de sitios de escisión proteolítica que se pueden escindir en condiciones ácidas son el sitio de escisión fluHA, el sitio de escisión de proteína F del virus Nipah fue sitio de escisión de catepsina.

35 En una realización alternativa, la proteína de interés no se fusiona con la proteína de fusión de la membrana viral. De hecho, se ha mostrado que dicha proteína de interés, cuando se sobreexpresa con la proteína de fusión de la membrana viral, se puede localizar en las microvesículas. Por lo general un motivo de farnesilo responsable de la farnesilación de la proteína y/o un motivo de miristilo responsable de la miristilación de la proteína se puede introducir con el fin de dirigir la proteína a la membrana.

40 En una realización, la proteína de fusión de la membrana viral y/o la proteína de interés puede contener un etiqueta que permite la purificación de las microvesículas liberadas desde la célula eucariota. Dicha etiqueta se puede situar por ejemplo en el ectodominio de la proteína de fusión de la membrana viral. Las etiquetas adecuadas incluyen, pero no se limitan a: etiqueta Flag, etiqueta HA, etiqueta GST, etiqueta His6. Dentro de la capacidad de la persona con experiencia en la materia está seleccionar la etiqueta apropiada y el método de codificación apropiados de dicha etiqueta. Los métodos de purificación adecuados incluyen, pero no se limitan a, inmunoprecipitación, cromatografía por afinidad, y perlas magnéticas revestidas con anticuerpo específico anti-etiqueta.

50 En una realización preferente, una célula eucariota de acuerdo con la divulgación está libre de virus, en particular, dicha célula eucariota no comprende ningún ácido nucleico que codifica una proteína estructural viral.

55 La presente divulgación también se refiere a una microvesícula secretada por una célula eucariota de acuerdo con la divulgación, en la que dicha microvesícula comprende dicha proteína de fusión de la membrana viral y dicha proteína de interés. En otra realización, dichas microvesícula se obtienen a partir de células eucariotas de acuerdo con la divulgación que comprende dicha proteína de interés que no se une con enlace covalente a dicha proteína de fusión de la membrana viral.

60 Sin desear quedar ligado por la teoría, se considera que dichas microvesícula son similares a exosoma y tienen un tamaño entre 40 y 150 nm, por ejemplo entre 40 y 100 nm, por ejemplo un tamaño medio de aproximadamente 100 nm. Por lo general una microvesícula de acuerdo con la divulgación tiene una densidad entre 1,08 g/ml y 1,12 g/ml. Preferentemente una microvesícula de acuerdo con la divulgación tiene una densidad entre 1,09 g/ml y 1,11 g/ml. Por lo general, dicha densidad se puede medir mediante sedimentación en un gradiente continuo de iodixanol como se define en el Ejemplo 1.

65 Cuando se usa la sobreexpresión transitoria de la proteína de fusión de la membrana viral y/o de la proteína de interés, las microvesículas por lo general se cosechan a partir del sobrenadante celular 48-72 horas después de la transfección. Por lo general, las microvesículas de acuerdo con la divulgación se pueden aislar por filtración (por

ejemplo en filtros de poro de 0,45 µm) del sobrenadante celular de células eucariotas de acuerdo con la divulgación y ultracentrifugación por ejemplo, mediante ultracentrifugación a 110000 g durante 1,5 horas. De forma ventajosa, las microvesículas de acuerdo con la divulgación se pueden congelar y almacenar a -80 °C sin perder su capacidad para transferir material a la célula diana.

5 En otra realización, dichas microvesículas de acuerdo con la divulgación no comprenden ningún ácido nucleico que codifica dicha proteína de interés.

10 En una realización preferente, una microvesícula de acuerdo con la divulgación está libre de virus.

15 Descrito en primer lugar para células del sistema inmunológico, las micro vesículas liberadas de células se encuentran *in vivo* en muchos fluidos corporales (Simpson *et al.*, Proteomics 8, 4083-4099 (2008)). Muchos estudios han resaltado el papel de estas microvesículas en la modulación de la respuesta inmunológica y la comunicación intercelular.

20 Sin desear quedar ligado por la teoría, se cree que las microvesículas de la divulgación son vesículas similares a exosomas, y la presencia de la proteína de fusión de la membrana viral permite que dichas microvesículas administren de forma eficaz el material contenido en dichas microvesícula as a la célula diana.

25 La presente divulgación también se refiere a un método *in vitro* para administrar una proteína de interés en una célula diana poniendo en contacto dicha célula diana con una microvesícula de la divulgación que comprende dicha proteína de interés.

30 Los ejemplos de células diana son líneas de células de laboratorio comunes tales como células Hela y derivados, células HEK293, células HEK293T, células NIH3T3 y derivados, células HepG2, células HUH7 y derivados, células de cáncer de pulmón microcítico, células Caco-2, células L929, células A549, células MDCK, células THP 1, células U937, células Vero y células PC12; células CD34+ hematopoyéticas humanas purificadas a partir de médula ósea, de sangre, de cordón umbilical; Células Dendríticas (DC) diferencias a partir de monocitos de sangre o de células CD34+; células humanas primarias purificadas a partir de sangre incluyendo linfocitos T (CD8 y CD4), linfocitos B (incluyendo linfocitos B de memoria), mastocitos, macrófagos, las DC, células NK; células de murino primarias purificadas a partir de sangre incluyendo linfocitos T (CD8 y CD4), linfocitos B (incluyendo linfocitos B de memoria), mastocitos, macrófagos, las DC, células NK; células MRC5 incluyendo fibroblastos humanos primarios, células IMR90; fibroblastos de murino primarios y células Madre Embrionarias (ES) de origen humano, murino, rata, pollo, conejo.

35 El tropismo de las microvesículas de la divulgación dependerá del tropismo de la proteína de fusión de la membrana viral usada.

40 Por ejemplo, VSV-G siendo pantrópico, las microvesículas de acuerdo con la divulgación que comprenden VSV-G se dirigirán casi a cualquier célula. Las microvesículas que comprenden una proteína de fusión de la membrana viral con un tropismo para células del tracto respiratorio se usarán preferentemente para dirigirse a las células diana del tracto respiratorio.

45 En una realización preferente las microvesículas de acuerdo con la divulgación se producen *in situ*, mediante cocultivo de las células diana con células productoras de microvesículas. En una realización específica, las células diana y las células productoras de microvesículas se sitúan físicamente en dos compartimentos diferentes separados por una pared porosa, en los que dicha pared porosa tiene poros con un diámetro más pequeño que el diámetro de las células eucariotas pero mayor que el diámetro de las microvesículas de interés. De forma ventajosa, las microvesículas tal como se producen por las células eucariotas de acuerdo con la divulgación se pueden difundir desde un compartimento al otro para alcanzar las células diana en el que pueden administrar las proteínas de interés.

50 Esta técnica permite la administración de proteínas en células diana, sin la necesidad de una etapa de aislamiento.

55 Por lo general en una célula diana se pueden administrar varias (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6...) proteínas de interés diferentes poniendo en contacto dicha célula diana con varias microvesículas de la divulgación diferentes que comprenden dichas varias proteínas de interés diferentes.

60 Por lo general, la puesta en contacto de dichas varias microvesículas diferentes puede ser simultánea o secuencial.

65 A diferencia de la administración genética conseguida por múltiples vectores virales, la administración de proteína con microvesículas de acuerdo con la divulgación es un método original para introducir rápidamente una función en una célula dirigida, sin implicación de la maquinaria de transcripción o cualquier proceso de integración viral que limitan la transducción en muchos tipos de células. Las microvesículas de acuerdo con la divulgación se podrían usar prácticamente en cualquier tipo de célula incluyendo células de reposo o células totalmente diferenciadas.

A diferencia de las técnicas de transferencia genética clásicas tales como transfección genética, el método de la

divulgación no depende de la transcripción y la traducción dentro de la célula diana, no altera el metabolismo celular. Por lo tanto, se cree que el método de acuerdo con la divulgación no activa ninguna respuesta al interferón Y por lo tanto es un método más específico para administrar una proteína de interés a una célula diana.

5 Debido a las bajas cantidades de material administrado por las microvesículas de acuerdo con la divulgación y a su naturaleza no genética, parece que las microvesículas son útiles para aplicaciones en las que la presencia baja y transitoria de proteínas puede conducir a efectos biológicos sorprendentes, es decir, a proteínas que tienen una penetrancia biológica elevada.

10 La persona con experiencia en la materia se quedará rápidamente los pares apropiados de proteínas de interés / célula diana, de acuerdo con cada objetivo específico. En lo sucesivo el presente documento se describen ejemplos no limitantes de aplicaciones de las células, microvesículas y método de acuerdo con la divulgación.

15 En un aspecto la divulgación se refiere al uso *in vitro* de las microvesículas de acuerdo con la divulgación.

En un aspecto la divulgación se refiere al uso *in vivo* de las microvesículas de acuerdo con la divulgación.

20 En un aspecto, la divulgación se refiere al uso de una microvesícula de acuerdo con la divulgación para aplicaciones no terapéuticas.

Por lo general, las microvesículas de acuerdo con la divulgación se pueden usar para introducir una proteína de interés en una célula diana *in vitro* con el fin de estudiar el efecto fisiológico de dicha proteína de interés. Existen muchas aplicaciones de la divulgación posibles como herramientas para investigación científica básica.

25 A modo de ejemplo, las células, microvesículas, y método de acuerdo con la divulgación se pueden usar con el fin de administrar cofactores específicos necesarios para la inducción de sistemas de expresión inducibles. Por lo general las proteínas de interés incluyen la Cre recombinasa (útil para inducción del sistema cre/lox), el transactivador tTA (útil para inducción del operador de tetraciclina). A menudo dichos cofactores son difíciles de introducir en células diana y es deseable controlar de forma precisa la cinética de los sistemas inducibles controlando de forma precisa la administración de la proteína de interés.

30 Otro ejemplo es la administración de una proteína celular que regula la diferenciación de la expansión celular o muerte, en un modelo celular *in vitro*. Por lo general, las células, microvesículas y métodos de la divulgación Se pueden usar para administrar un factor pro-apoptótico tal como Bax-2 y para identificar sistemáticamente moléculas que modulan la apoptosis.

35 La divulgación también se refiere a una microvesícula de acuerdo con la divulgación para uso en terapia.

40 La divulgación también se refiere a una microvesícula de acuerdo con la divulgación para uso en la prevención de rechazo de injerto.

45 Se ha mostrado que ciertas proteínas de la superficie celular influyen en la capacidad migratoria o en el injerto de células madre hematopoyéticas (HSC). Por ejemplo, la administración transitoria de CXCR4 puede ser útil en terapia celular usando HSC como molécula de asentamiento con el fin de estimular el proceso del injerto. Podría ser deseable usar una transferencia genética, que podría dar como resultado la transferencia de CXCR4 a todas las células descendientes. Por el contrario, el método de la divulgación permite la transferencia de proteínas transitoria y controlada solamente durante el tiempo necesario para que se produzca el injerto.

50 La divulgación también se refiere a un método para inducir o potenciar la diferenciación celular mediante la administración de factores de transcripción. En particular, las células y microvesículas de la divulgación se pueden usar para diferenciación de megacariocítica, diferenciación de células mieloides, diferenciación de células linfoides, diferenciación de NK, diferenciación de astrocitos, maduración de precursores oligodendrocíticos, diferenciación de células musculares, diferenciación de queratinocitos, diferenciación retiniana, diferenciación de células eritroides, diferenciación de adipocitos.

55 Otra posible aplicación es la potenciación de la infección viral mediante administración de (co)receptores virales a células diana. Por ejemplo, las células y microvesículas de la divulgación se pueden usar para administrar receptores y correceptores del VHV, receptor del VHB, receptores del virus de la fiebre hemorrágica, receptores y correceptores del VIH-1, y receptor del MLV-E.

60 En particular, la divulgación se refiere a la administración de un receptor, por ejemplo un receptor que hace que una célula sea transitoriamente permisiva para una partícula viral ecotrópica.

65 A modo de ejemplo, las microvesículas, células y método de la divulgación se pueden usar para administrar un receptor ecotrópico EcoR (tal como m-CAT1) a una célula diana con el fin de hacer que sea permisiva para un virus ecotrópico. A continuación cualquier gen de interés se puede administrar a la célula diana (que expresará el receptor

ecotrópico) a través de una construcción viral ecotrópica apropiada.

Como se usa en el presente documento, el término "ecotrópico" tiene su significado general en la técnica. Un virus ecotrópico es un retrovirus que se puede replicar solamente en el hospedador de la especie en la que se origina. De forma más específica, la expresión "vivos ecotrópico", como se usa en el presente documento, se refiere a un virus de roedor que solamente se puede replicar en una célula que expresa su receptor afín, el receptor eco trópico EcoR.

De forma ventajosa, dicho virus ecotrópico es seguro para el manipulador ya que no puede infectar células humanas distintas a aquéllas a las que se ha dirigido mediante una microvesícula que expresa el receptor viral ecotrópico.

Por lo general, dicho virus ecotrópico es un retrovirus basado en el virus Moloney y dicho receptor ecotrópico es m-CAT1. Un ejemplo de un gen que codifica m-CAT1 se muestra en la secuencia de Referencia de NCBI con número de registro en Genbank NM_007513.3.

Por consiguiente, la divulgación se refiere a un método para administrar una proteína de interés a una célula que comprende las etapas de:

- administrar un receptor viral ecotrópico EcoR a una célula diana mediante una microvesícula que comprende una proteína de fusión de la membrana viral, por ejemplo VSV-G y dicho receptor viral ecotrópico EcoR; y,
- administrar una proteína de interés a dicha célula diana mediante un virus ecotrópico que comprende al menos un gen que codifica una proteína de interés.

Además, las células y microvesículas de la divulgación pueden ser para potenciación de la infección viral o producción viral/vector mediante la administración de proteínas virales trans-activadas (incluyendo proteínas del VHC, proteínas del VHB, proteínas del VIH-1/2 o proteínas del VIS, proteínas del virus de la fiebre hemorrágica, proteínas del virus de la gripe, proteínas del EBV, proteínas de SV40) para células que producen vivos.

Otra posible aplicación es la administración de un receptor que hace que una célula sea transitoriamente permisiva para una señal extracelular.

A modo de ejemplo, las microvesículas, células y método de la divulgación se pueden usar para introducir un TCR antiviral en linfocitos T como células diana, y para usar dichos linfocitos T por sus propiedades antitumorales (Cohen *et al.*, Cancer Research, 2007, 67, 3898-3903; Johnson *et al.*, J Immunol. 2006, 177, 6548-6559 y Zhao *et al.*, J Immunol, 2005, 174, 4415-4423).

Por lo tanto, la divulgación también se refiere a una microvesícula de acuerdo con la divulgación para uso en el tratamiento de cáncer.

En el campo de la vacunación, como células de presentación de antígenos con el fin de estimular la respuesta inmunológica a menudo se usan células dendríticas (DC).

Sin embargo, las células dendríticas le existen como líneas celulares y se deben obtener mediante cultivo primario.

La presente divulgación proporciona las DC sustitutas que se pueden usar para fines de vacunación. De hecho, el método de la divulgación se puede usar para proporcionar líneas de células productoras modificadas que producen microvesículas que contienen MHC o factores de coestimulación y/o antígenos. Dichas microvesículas se pueden usar con fines de vacunación.

Las células, microvesícula sin métodos de la divulgación también se pueden usar para administrar antígenos específicos para células de presentación de antígeno con el fin de estimular una respuesta inmunológica.

En lo sucesivo, la divulgación se ilustrará por medio de los siguientes ejemplos y figuras.

Descripción de las figuras

Figura 1: Incorporación de YFP en microvesículas portadoras de VSV-G

(A) Análisis de transferencia de Western de microvesículas concentradas producidas por 293T-YFP transfectadas con pVSV-G (calle 1), pVSV-G V72 (calle 2), SwFlagEcoR (calle 3), SwFlagEcoR y pVSV-G (calle 4) y transfectadas de forma simulada (calle 5). Se realizaron inmunotinciones con los Mab dirigidos contra VSV-G (P5D4), la etiqueta Sigma (M2) que revela la versión etiquetada de EcoR e YFP (GSN24).

(B) Análisis de FACS de células expuestas a las microvesículas de las células que expresan VSV-G e YFP, en comparación con células expuestas a microvesículas de células que expresan YFP solo.

(C) Las células HEK se transfectaron con un plásmido codificante de la proteína VSV-G de tipo silvestre (wt) o un

mutante W72V con deficiencia de fusión (se sometieron a ensayo 2 clones de ADN). En el experimento también se incluyó una forma truncada de VSV-G sometida a delección para su ectodominio. 48 h después de la transfección, los sobrenadantes se cosecharon y las células se sometieron a lisis para un análisis de transferencia de Western. Todas las proteínas estaban altamente expresadas en las células productoras. Sin embargo, en el sobrenadante solo se detectó el VSV-G de wt y no el mutante con deficiencia de fusión.

(D) Las células HEK se transfectaron como se ha mencionado anteriormente y se incubaron, 20 horas después de la transfección, en un medio que contenía 0,2 µg/ml de R18, un compuesto lipófilo fluorescente que se unía a membranas, durante 6 horas. 72 horas después de la transfección, los medios de los diferentes tipos celulares se recogieron, se aclararon y se analizaron con un fluorómetro para cuantificar la cantidad de fluorescencia asociada a R18, lo que refleja la cantidad de membranas liberadas de sobrenadante. Los resultados se proporcionan como el valor de R18, normalizado por el número de células vivas.

Figura 2: Análisis bioquímico y funcional de microvesículas revestidas con CD81/VSV-G

(A) Expresión de CD81 en células productoras 293T. Se usó un control isotópico de IgG de ratón (zona sombreada).

(B) Expresión de CD81 en células HepG2 expuestas a microvesículas concentradas, una hora después del tratamiento. Las células HepG2 no tratadas también se etiquetaron (control sombreado de color gris).

(C) Potenciación de la transducción de HCVpp en células HepG2 tratadas con diversas dosis de microvesículas. Se produjeron YFO que codifican HCVpp en 293 células y se hizo una valoración previa sobre células HUH 7.2 a 8×10^4 unidades de transducción (UT) por ml. La figura proporciona las titulaciones de HepG2 que aumentan con la cantidad de microvesículas a las que se han expuesto.

(D) Análisis de densidad de microvesículas portadoras de CD81. Las microvesículas se produjeron en células 293T cultivadas con cloruro de octadecilrodamina B (R18), un fluoróforo que etiqueta lípidos de membrana. Las microvesículas concentradas se dejaron en un gradiente de iodixanol continuo y se centrifugaron 12 horas a 41000 rpm en un rotor SW41. A continuación se recogieron 20 fracciones de 0,5 ml y 1/20 de cada fracción se analizó mediante transferencia de Western en condiciones seminativas. Los inmunoetiquetados de VSV-G y CD81 se muestran para fracciones de 13 a 20 y estaban ausentes a partir de otras fracciones (no se muestra).

Figura 3: Caracterización de Gesículas

(A) Florescencia asociada a la membrana infracciones recogidas después de gradiente de iodixanol de densidad. Las gesículas de VSV-G concentradas se dejaron en un gradiente de iodixanol continuo y se centrifugaron 3 horas. De la parte inferior del tubo se recogieron 20 fracciones de 500 µl, la fracción 1 correspondiendo a una densidad de 1,46 y la fracción 20 a una densidad de 1,07 tal como se indica. 1/5 de cada fracción (100 µl) se pesó y se transfirió a una placa de 96 pocillos antes de la análisis en un fluorómetro. La figura proporciona los valores de emisión a 590 nm después de excitación de R18 a 560 nm.

(B) Caracterización de Gesículas portadoras de YFP y CD81

Panel de la parte superior: análisis de fluorescencia asociada a YFP en fracciones recogidas después del gradiente de densidad. Las Gesículas de VSV-G concentradas producidas en células positivas para YFP se dejaron en un gradiente de iodixanol continuo y se centrifugaron 3 horas. De la parte inferior del tubo se recogieron 20 fracciones de 500 µl, la fracción 1 correspondiendo a una densidad de 1,3 y la fracción 20 a una densidad de 1,09 tal como se indica. 1/5 de cada fracción (en microlitros) se pesó y se transfirió a una placa de 96 pocillos antes de la análisis en un fluorómetro. La figura proporciona los valores de emisión a 533 nm después de excitación de YFP a 495 nm.

Panel de la parte inferior: Análisis de pseudotransducción de YFP en células humanas. 1/10 de cada fracción se dejaron en 1×10^5 de células HEK cultivadas en una placa de 12 pocillos. 24 horas más tarde, las células se analizaron por FACS. La figura indica la intensidad media de fluorescencia (MFI) de cada población celular expuesta a las diferentes fracciones.

Figura 4: Administración de EcoR en células humanas mediante Gesículas portadoras de EcoR

(A) Representación esquemática de plásmido que codifica mCAT-1 en el que pCMV representa el promotor de citomegalovirus humano temprano, USiT para un concatémero de tres secuencias repetidas dirigidas por un ARNsi universal, PA para la señal de poliadenilación del VIS. El ARNm que se representa a continuación está equipado con la secuencia USiT, que hace que sea altamente sensible a la degradación mediada por el ARNsi universal.

(B) Titulación de vector lentiviral que codifica GFP pseudotipado con la envoltura Ecotrópica de MLV en células 293T tratadas con Gesículas de mCAT-1. Las células HEK 293T se trataron durante 1 hora a 37 °C con 2 µg

(calle 1) o 4 µg (calle 2) de Gesículas concentradas. Después de 2 lavados con PBS, las células se transdujeron con 100 µl de una preparación de GFP lentivectores GFP pseudotipados con la envoltura Ecotrópica de MLV (calles 1, 2 y 3) o con la envoltura del VSV-G (calle 4). Tres días después de la transducción, las células se analizaron por FACS y las titulaciones de la preparación de lector se calcularon y se proporcionan como medio de 3 ensayos de transducción diferentes.

Figura 5: análisis bioquímico y funcional de Gesículas portadoras de mCAT-1

Las Gesículas se prepararon después de cotransfección de células HEK293T mediante VSV-G y una versión etiquetada de mCAT-1, el receptor para la cepa ecotrópica del virus de la leucemia murina. El medio celular se cambió 24 h después y se recogió al día siguiente. Los sobrenadantes se aclararon antes de una ultracentrifugación a 35000 rpm durante 1 h 30 en un rotor SW-41. El sedimento se volvió a suspender en PBS y se congeló antes del proceso de purificación por densidad.

Centrifugación zonal de tasa a través de gradientes de iodixanol continuos: las vesículas concentradas sin procesar se cubrieron en un gradiente Optiprep continuo (6 % de iodixanol en sacarosa 215 mM, EDTA 2 mM, 10 mM Tris HCl pH 8 / 56.4 % iodixanol en 5 mM sacarosa, 2 mM EDTA, Tris HCl 10 mM a pH 8) y se centrifugaron durante 12 horas a 41000 rpm en un rotor SW41. Las fracciones (0,5 ml) se recogieron de la parte inferior de los gradientes y se mantuvieron a 4 °C antes del análisis de transferencia de Western y el ensayo funcional. La densidad de las fracciones se midió pesando cuidadosamente 100 µl de cada fracción.

La proteína de las fracciones 12 a 20 se separó mediante SDS-PAGE usando geles de Bis-Tris NuPage al 4-12 % (Invitrogen) desarrollados en tampón MOPS. Se analizaron 5 µl de cada fracción. Después de electrotransferencia sobre una membrana de nitrocelulosa, las proteínas se revelaron mediante un anticuerpo conjugado con peroxidasa dirigido contra VSV-G (P5D4 Sigma) diluido a 1/1000 o una anti-Flag conjugada con peroxidasa (Sigma) a 1/1000, ambos incubados una obra a temperatura ambiente.

Para evaluar la actividad biológica de las fracciones, se añadieron 30 µl de cada muestra a células 293T sembradas a 1x10e5 células por pocillo en una placa de 24 pocillos. Una hora más tarde el medio se sustituyó por 200 µl de medio recién preparado suplementado con 200 µl de sobrenadante que contenía lentivector codificante de GFP pseudotipado con la envoltura Ecotrópica. 48 horas después de la transducción las células se sometieron a tripsina y los valores de fluorescencia (MFI) se analizaron por FACS.

Figura 6: Desaparición de mCAT-1 transferido en células humanas tratadas con Gesícula

Las células HEK293T se expusieron a dosis de su saturación de EcoR-Gesículas durante 1 hora a 37 °C. Después de dos lavados, las células se transdujeron con lentivectores de GFP pseudotipados con la envoltura Ecotrópica 5 min, 12 horas, 24 horas o 45 horas después de exposición a Gesícula. El mismo ensayo de transducción se realizó en células 293T que expresan EcoR de forma estable para medir la disminución progresiva de la titulación del lentivector debido a la división de célula diana. Los resultados se proporcionan como el porcentaje de eficacia de transducción con respecto al valor de transducción obtenido en el momento 5 min (100 %). Todos los valores se corrigieron con respecto a la tasa de división celular.

Figura 7: La degradación específica del ARNm de EcoR no influye en la función de EcoR introducida por Gesículas.

Validación funcional del si-mCAT.

Un ARNsi sintético diseñado contra mCAT-1 se transfectó en células humanas además de con un plásmido codificante de un mCAT-1 etiquetado. Las células si-mCAT y si-CTL se examinaron a continuación para su expresión de mCAT y su permisividad a la transducción con vectores lentivirales de control Ecotrópico (EcoLV) (barras de color negro) y de control pantrópico (gLV) (barras de color gris).

(A) Inmunotinción de mCAT-1 en células si-CTL y si-mCAT

(B) Ensayo de transducción con lentivectores con GFP en células diana transfectadas con mCAT-1.

Los valores de transducción se analizaron con FACS 72 horas después de la transducción y se establecieron en una eficacia de un 100 % para células si-CTL. Un 70 % de la transducción de EcoLV se inhibe en células tratadas con si-mCAT mientras que la transducción mediada por gLV casi se ve sin afectar (8 % de inhibición).

La degradación específica del ARNm de mCAT en células diana apenas influye en la función de EcoR transferido por Gesículas.

(C) Ensayo de transducción con lentivectores Ecotrópicos de GFP en células humanas tratadas con Gesículas de mCAT. Las células tratadas con vesículas de mCAT y portadoras de si-mCAT permanecen altamente

permissivas con respecto a la transducción de EcoLV (87 % del control). Esto indica que la función de EcoR está proporcionada principalmente por la proteína mCAT contenida en microvesículas y no por el ARNm simultáneo ni por el ADN plasmídico.

5 **Figura 8: Efecto de la cloroquina en transducción lentiviral ecotrópica en células modificadas con EcoR-Gesículas.**

Los vectores lentivirales que codifican YFP con la envoltura Ecotrópica (Eco) se usaron para células HEK293T transductoras en las que la proteína mCAT-1 se administró mediante Gesículas de EcoR (EcoR-Ges) en presencia o ausencia de cloroquina (CQ), un fármaco que aumenta la pH endosómica (calle 3). Como un control, se usaron pseudotipos Ecotrópicos para células 293T transductoras en las que la EcoR se expresa de forma estable (EcoR estable, calle 2). Para comprobar el efecto de CQ en la acidificación endosómica, se usaron lentivectores de VSV-G para transducir células diana tratada solo con el fármaco, lo que ilustra la alta dependencia de pH de pseudotipos de VSV-G (calle 1) mientras que el pseudotipo ecotrópico sigue siendo eficaz después del tratamiento farmacológico. Los resultados se proporcionan como la eficacia de transducción de YFP relativa en los diferentes tipos celulares tal como se mide con FACS 72 horas después de la transducción.

Figura 9: Administración de tTA mediante Gesículas

20 Para detectar la función de transcripción de la proteína de transactivación de TET (tTAoff) los inventores crearon una línea de células indicadoras que expresaban eGFP de forma estable bajo el control del operador TET. La transfección de tTA activo la expresión de eGFP en la línea de células indicadoras (calle de tTA) en comparación con células transfectar las de forma simulada. Las gesículas producidas en células que sobreexpresan tTA y VSV-G (wt) o su montante V72 incompetente de fusión se concentraron y se dejaron en la línea de células indicadoras a diferentes dosis. El aumento de la dosis de Gesículas de tTA que alojan el VSV-G de wt dio como resultado un aumento de la expresión de GFP. Esta señal se pudo anular mediante la introducción de Doxiciclina en el medio. Los resultados se proporcionan como MFI analizada por FACS 24 horas después de la administración de Gesículas.

30 **Figura 10: Eficacia de la transferencia de tTA mediada por Gesícula como una función del tiempo**

La línea de células indicadoras de HEK, Teo-GFP, se sembró en placas de 12 pocillos (1x10e5 células por pocillo) y se trataron con Gesículas de tTA (50 µg de total protein). El tiempo de exposición varió de 5 minutos a 4 horas. Después de la exposición, el medio que contenía vesículas se descartó hoy las células se lavaron con PBS y se mantuvieron en cultivo para un análisis de GFP 24 horas más tarde. La eficacia de la transferencia de tTA aumenta gradualmente con el tiempo de exposición hasta 3 horas que es el tiempo óptimo de exposición.

Figura 11: La proteína VSV-G potencia la liberación de vesículas y la liberación de la proteína de interés de células 293T

40 *Liberación de proteína de membrana:* el análisis WB de mCAT-1, una proteína de dominio de múltiples membranas incorporada en vesículas producida con o sin VSV-G. El inmunoetiquetado de mCAT-1 en el sedimento de la vesícula muestra que la liberación de mCAT-1 aumenta de forma radical cuando se introduce VSV-G en las células productoras.

45 *Liberación de proteína citoplasmática:* un análisis bioquímico similar se realizó en diferentes lotes de preparaciones de vesícula, investigando la liberación de la actina de la proteína citoplasmática. Los inventores observan que la VSV-G potencia ligeramente la liberación de actina en comparación con vesículas simuladas.

50 **Figura 12: Transferencia de proteína mediada por gesícula en un experimento de cocultivo a través de inserciones con un tamaño de poro de 3 µm**

Los inventores cultivaron, en el mismo medio, células transfectadas con diversas combinaciones de plásmidos con la línea de células indicadoras de Teo-GFP indicador. Las células se con un filtro con un tamaño de poro de 3 µm tal como se representa, las células productoras en la parte inferior de una placa de 6 pocillos y la línea de células indicadoras en la inserción de la parte superior. Las células productoras se cotransfectaron con un plásmido de expresión de tTA además de con un ADN vehículo, el plásmido que codifica VSV-G o una proteína VSV-G con deficiencia de fusión. Después de 48 horas de cocultivo, las inserciones se retiraron y la línea de células indicadoras se sometió a tripsina y se analizó con FACS para evaluar la administración de tTA. Los resultados se proporcionan como la MFI en la línea de células Teo-GFP.

60 **Figura 13: Caracterización de microvesículas obtenidas a partir de células de insecto**

Las microvesículas de GFP se produjeron infectando células Sf9 durante 72 horas con baculovirus recombinante. Después de concentración, se dejaron en un gradiente de iodixanol y se centrifugaron durante 10 h a 215000 g para permitir la sedimentación de vesículas de acuerdo con su densidad. Las fracciones se recogieron de la parte inferior del tubo y su densidad se midió mediante pesada.

El gradiente de densidad se puede observar en el gráfico A, que varía de $d = 1,3$ a $d = 1,05$. Todas las fracciones se analizaron con un fluorómetro para detectar GFP (Exc 485 Em 515), esencialmente detectado en la fracción 21 (A, barras de color blanco). Las diluciones de las fracciones también se usaron para infectar células sf9 para identificar cuando sedimentaba el baculovirus. Tres días después la infección, las células sf9 se analizaron por FACS y se hizo la titulación del Baculovirus. Los resultados que se proporcionan en A (barras de color negro) indicó que el virus había sedimentado.

(B) La capacidad de transferencia de GFP de cada fracción se analizó. Estaba contenida en las fracciones 14 a 19, solapando parcialmente las fracciones que contenían el virus.

Figura 14: Ensayo de neutralización (NA) de microvesículas de insecto tTA

Las microvesículas de tTA se produjeron en células High5 infectadas con un baculovirus de tTA. Las vesículas se concentraron y se volvieron a suspender en PBS y se diluyeron 10 veces para el ensayo realizado en 100 μ l de PBS. SE incubaron 0,5 eq de tTA Fosfolíp 2 h a 37 °C con dilución es en serie de anticuerpo anti gp64 (clon AcV1) o anticuerpo de control (GST). A continuación las vesículas se dejaron en una célula indicadora de tTA de HEK (que expresa GFP una vez que tTA se introduce en la célula). 24 horas más tarde, las células expuestas a vesículas se analizaron por FACS y la expresión de GFP se cuantificó. Los resultados se proporcionan como la MFI de la población global.

Figura 15: Respuesta a la dosis usando microvesículas de tTA

Las vesículas de insecto tTA se concentraron y se purificaron como se ha descrito anteriormente se almacenaron a -80 °C. El aumento de las dosis de las vesículas se usó para administrar tTA en una línea de células indicadoras de tTA de HEK, dando como resultado un aumento de la señal de GFP detectada en células diana 24 horas después de las vesículas. Las células tratadas con doxiciclina mostraron fluorescencia de fondo, lo que refleja la inducibilidad esperada del sistema TET.

Figura 16: La transferencia de tTA en células humanas se consigue con microvesículas obtenidas a partir de células de insecto y no mediante baculovirus codificantes

(A) Construcciones de baculovirus

(B) Expresión de GFP de tTA dirigida por promotor en la línea de células indicadoras de tTA

(C) Liberación de GP64 y tTA en Vesículas

(D) Expresión de GFP en la línea de células indicadoras de tTA después de tratamiento con microvesículas purificadas con pH o CMV.

Ejemplos

Ejemplo 1

Resumen

El presente ejemplo describe la modificación por ingeniería de vesículas de tipo exosoma revestidas con la glicoproteína G del Virus de la Estomatitis Vesicular (VSV-G) y usadas para administrar proteínas exógenas en células diana humanas. Estas partículas sedimentan a una densidad de 1,1 g/ml y pueden empaquetar de forma eficaz proteínas de la membrana citoplasmática y de membrana así como factores de transcripción. Las moléculas a modo de modelo que incluyen la proteína mCAT-1 de membrana y el transactivador de tet se administran de forma eficaz en células diana humanas después de tratamiento con microvesículas. La pseudotransducción mediada por vesículas condujo a la expresión de proteína transitoria y no se debió a la transferencia de ARNm o ADN. Los inventores mostraron que la cloroquina, un fármaco que aumenta la pH endosómica, invalidaba la transferencia de proteína lo que indica que la fusión inducida por VSV-G estaba implicada en el mecanismo de administración.

La envoltura fusogénica de VSV-G es un determinante fundamental de la pseudotransducción

Los inventores sometieron a ensayo y la expresión de VSV-G podría conducir a la producción de partículas capaces de pseudotransducción. Las células HEK-293T que expresan YFP (293T-Y) de forma estable se transfectaron con pVSV-G, un vector de expresión eucariota. Los sobrenadantes se recogieron dos días más tarde, se filtraron y se concentraron mediante ultracentrifugación. Como un control, s el mismo proceso se aplicó a sobrenadantes de células 293T-Y transfectadas de forma simulada. Las dos preparaciones concentradas se añadieron en células 293T sin tratamiento previo, que se lavaron después de una hora de exposición. 24 horas más tarde, las células se sometieron a tripsina y se analizaron por FACS para medir la fluorescencia en las dos poblaciones. Los inventores fueron capaces de observar pseudotransducción de YFP en células expuestas a la preparación de VSV-G y no en

células expuestas a la preparación de control (**figura 1-B**). El análisis bioquímico de las dos muestras desveló que sedimentaban cantidades elevadas de YFP en la preparación de VSV-G (**figura 1-A** calle 1) mientras que YFP era casi indetectable en la preparación transfectada de forma simulada (calle 5). Estos datos indican que VSV-G es responsable de la liberación intensa de partículas que se pueden sedimentar que contienen componentes del citoplasma de células productoras. Además, parece que estas partículas son capaces de administrar este material en células diana. Como las células se lavaron después del tratamiento con partículas y se cultivaron durante 24 horas antes del cargamento con tripsina y análisis, los inventores supusieron que la señal de YFP es intracelular y no es debida a las partículas adsorbidas fluorescentes en la superficie de las células. Estas microvesículas de VSV-G se denominarán Gesículas a través del ejemplo 1.

Observaciones adicionales: un mutante de aminoácido individual de VSVG incapaz de desencadenar fusión (VSVG V72) 14 se sometió a ensayo en este sistema y no se incorporó en el gránulo sedimentado (**figura 1** calle 2). Otro experimento de transferencia de Western indicó que este mutante se expresaba en células productoras pero no detectables en el sobrenadante, a diferencia del wt-VSV-G detectable tanto en células como en sobrenadante (Figura 1C). Esto demuestra que la producción de microvesículas de VSV-G requiere una forma competente de fusión de VSV-G en la célula productora.

Pseudotransducción de la proteína tetraspanina CD81

La transferencia de célula a célula de una proteína citoplasmática tal como YFP mediante una preparación concentrada apoya la idea de que las células 293T-Y han producido vesículas portadoras de YFP rodeadas por una capa lipídica y posiblemente revestidas con otras proteínas de células 293T similares a las proteínas de membrana. Para someter a ensayo esta hipótesis, los inventores prepararon un nuevo lote de Gesículas mediante transfección de células 293T células con VSV-G y usaron esta preparación concentrada para investigar la transferencia de la proteína CD81, una proteína tetraspanina característica de exosomas y expresada abundantemente en células 293T (**figura 2 A**). El material resultante se aplicó en células HepG2, una línea de células de hígado humano que carecen de CD81. Los inventores mostraron que las células HepG2 expuestas a Gesículas durante una hora se tenían de forma positiva después de un inmunoetiquetado de CD81, lo que indica que la proteína se transfirió desde la célula productora a la célula diana (**figura 2. B**).

Se sabe que la introducción de CD81 exógeno en HepG2 permite la transducción de esta línea celular por vectores retrovirales pseudotipados con la envoltura del VHC (HCVpp) (Zhang. *et al.*, Journal of virology 78, 1448-1455 (2004)). De hecho CD81 se describe como uno de los receptores del VHC reconocidos por la glicoproteína E2. Por lo tanto para validar adicionalmente la transferencia de CD81, los inventores expusieron las células HepG2 a diversas dosis de Gesículas y comprobaron su permisividad a la transducción mediada por HCVpp en comparación con células HepG2 sin tratamiento previo. Los inventores mostraron que la permisividad de HepG2 con respecto a la transducción de HCVpp aumenta con la cantidad de Gesículas introducidas en células (**figura 2.C**), lo que aumenta la titulación de HCVpp hasta 5 veces en este experimento. Esto muestra que la proteína CD81 transferida retiene su capacidad de unión al VHC incluso después de transporte y transferencia a través de Gesículas.

Caracterización de las Gesículas portadoras de YFP y CD81

Para caracterizar mejor el material responsable de la transferencia de proteína, se produjeron Gesículas después de la transfección de VSV-G en células humanas cultivadas con cloruro de octadecil rodamina B (R18), un fluoróforo lipófilo que etiqueta las membranas. Después de una primera etapa de concentración, las R18-Gesículas se dejaron en un gradiente de iodixanol continuo y se centrifugaron 3 horas para permitir la separación de fracciones de acuerdo con su densidad. Todas las fracciones de 1 a 20 recogidas se analizaron para su capacidad al emitir fluorescencia a 590 nm después de excitación a 560 nm, los valores de emisión y excitación para R18. Como se muestra en la **figura 3A**, la fluorescencia de R18 se detectan las fracciones 13 a 20 con un pico en la fracción 17 que corresponde a una densidad de 1,11 g/ml.

En otro experimento, las Gesículas producidas en células 293T-Y se procesaron del mismo modo que se dejaron en un gradiente antes del análisis de fluorescencia asociada a YFP en las diferentes fracciones recogidas. La **Figura 3B** indica que YFP se detectaba principalmente en las fracciones 17 y 18 que corresponden a densidades de 1,10-1,11. A continuación los inventores examinaron la fracción que era capaz de administrar YFP mediante pseudotransducción. 1/10 de cada muestra se aplicó en células 293T y las transferencias de fluorescencia se analizaron por FACS 24 horas más tarde. Como se muestra en la **figura 3**, el determinante de la pseudotransducción se sedimentó esencialmente en la fracción 17 (d = 1,11). En otro experimento, las Gesículas se separaron y se analizaron mediante transferencia Western. El análisis de las fracciones de densidad desveló que VSV-G y CD81 estaban claramente enriquecidas en las fracciones 17:18 que corresponden a densidades de 1,10 y 1,11 g/ml (**figura 2 D**). Como la molécula de CD81 se describe como un marcador para exosomas (Lamparski *et al.*, Journal of immunological methods 270, 211-226 (2002)) los inventores pueden concluir que las Gesículas que portan VSV-G son un tipo particular de vesículas de tipo exosoma.

Combinados, los hallazgos de los inventores indican que, después de la transfección de VSV-G, las células HEK 293T producían Gesículas rodeadas por membrana sedimentables a una densidad de 1,10-1,11 g/ml y que estas

microvesículas similares a exosomas contienen proteínas tales como CD81 de las células productoras que se pueden administrar en células diana.

Transferencia de mCAT-1 mediada por gesículas en células humanas.

5 De la misma manera que YFP o CD81 altamente expresadas se empaquetan en Gesículas producidas por células 293T-Y/293T, los inventores sometieron a ensayo si cualquier proteína sobreexpresada en la célula productora se podría incorporar de forma pasiva en Gesículas emergentes y si se podrían administrar bajas cantidades de este material empaquetado en células diana humanas. Esta noción se sometió a ensayo usando la proteína mCAT-1
10 como un modelo, el transportador de aminoácido catiónico de murino como el receptor para la envoltura Ecotrópica EcoR1 del virus de la leucemia murina (MLV). Un plásmido que codifica una versión etiquetada de mCAT-1 se construyó (SwFlag EcoR representado en la **figura 4**) y se cotransfectó con VSV-G en células 293T-Y para producir Gesículas concentradas portadoras de EcoR introducidas posteriormente en células humanas. Después de una hora, las células expuestas se lavaron y se tiñeron de forma positiva para expresión de EcoR como se desvela
15 mediante un análisis de FACS usando un anticuerpo anti Flag-FITC (no se muestra). Para validar adicionalmente la transferencia de mCAT-1, los inventores desarrollaron un ensayo de transducción basado en lentivectores que codifican YFP pseudotipado con la envoltura Ecotrópica de MLV. Debido al tropismo particular de esta glicoproteína, estos lentivectores pueden transducir de forma exclusiva células de murino/rata o células humanas en las que mCAT-1 se expresa después de la transfección. Si las Gesículas de EcoR administran EcoR de forma eficaz en células
20 humanas, éstas deberían llegar a ser permisivas para una lentitransducción de YFP Ecotrópico.

Los resultados que se muestran en la **figura 4** proporcionaron las titulaciones de una preparación de lentivector Ecotrópico después de valoración en células humanas tratadas o no con Gesículas de EcoR. Aunque las células se limitan a transducción con un lentivector Ecotrópico (calle 3), las células tratadas con 2 µg (calle 1) o 4 µg (calle 2)
25 de Gesículas concentradas llegan a ser altamente permisivas a la transducción Ecotrópica. Para evitar la incorporación de Gesículas-proteína G en lentivectores Ecotrópicos en el medio de transducción, las células tratadas con Gesículas se lavaron dos veces antes de la transducción.

La preparación de Gesículas de EcoR se dejó en un gradiente de densidad como se ha descrito anteriormente para
30 identificar la fracción responsable de la transferencia de mCAT-1. Las fracciones recogidas se analizaron mediante transferencia de Western y para su capacidad para mediar la transferencia de EcoR (**Figura 5**). En este experimento, los inventores muestran que la fracción 17 que corresponde a una densidad de 1,10 está altamente enriquecida en VSV-G y mCAT-1 y es la fracción principal responsable de la transferencia de EcoR como se desvela mediante un ensayo de transducción. Estos datos indican que las Gesículas de EcoR que sedimentan a una
35 densidad de 1,10 transfirieron la proteína mCAT-1 en la membrana de células diana en las que se retiene su propiedad de unión para la envoltura ecotrópica.

Además, en el presente documento los inventores muestran que el contenido de Gesícula, y en particular la naturaleza de las proteínas transmitidas por la membrana de las Gesículas se puede encontrar fácilmente mediante
40 transfección de células productoras.

Mecánica de administración de EcoR por Gesículas

Periodo de duración del mCAT-1 transferido

45 A continuación los inventores examinaron el periodo de duración del mCAT-1 transferido en células humanas variando el retraso entre la exposición de Gesículas y el ensayo de transducción. Los resultados que se muestran en la **figura 6** indican que la función del receptor Eco desapareció de la superficie de las células 293T aproximadamente 50 horas después de su transferencia mediada por Gesícula. Este excremento se reprodujo en
50 diferentes tipos de células humanas incluyendo células Hela, HUH.7 (no se muestra) sin modificación de la semivida del mCAT-1 transferido cerca de 24 horas. Esta corta duración dar comodidad a la noción de las proteínas de administración de Gesículas y no ADN plasmídico que podrían contaminar la preparación de Gesículas. De hecho la codificación de mCAT-1 por ADN plasmídico podría necesitar una transcripción y una etapa de traducción en las células diana, conduciendo a un máximo de expresión 48 h después de su introducción tal como se observa
55 normalmente para experimentos de transfección.

La función de EcoR se proporciona mediante proteínas recién preparadas incorporadas en Gesículas.

60 Para investigar la naturaleza del material transferido con las vesículas de mCAT-1, los inventores trataron células diana humanas con ARNsi dirigido contra el ARNm mCAT-1. Si las vesículas administran ARNm o ADN que lo codifica, se podría degradar rápidamente en células tratadas con si-mCAT.

Tal como se desvela con una inmunotinción de mCAT-1 (**Figura 7A**), el ARNsi de mCAT-1 suprimió la expresión de mCAT después de un experimento de cotransfección en células HEK. Además como la introducción de este ARNsi
65 específico en células transfectadas con un plásmido mCAT-1 disminuyó fuertemente la capacidad de las células para ser transducidas con lentivectores ecotrópicos (**Figura 7B**). Aunque los lentivectores pseudotipados de VSV-G

(gLV) transdujeron de forma eficaz células tanto si-CTL como si-mCAT, la eficacia de transducción conseguida con lentivectores ecotrópicos (EcoLV) se inhibió en células si-mCAT (70 % de inhibición). Estos datos indican que el si-mCAT influye de forma específica en la función del receptor mCAT-1 cuando éste está codificado por un plásmido.

5 A continuación los inventores examinaron si el ARNsi de mCAT influya en la función del receptor administrado por microvesículas de mCAT-1. Las células se transfectaron con los ARNsi de mCAT y de control y se trataron con vesículas de mCAT-1 48 horas más tarde. A continuación se realizó un ensayo de transducción con EcoLV para comprobar la función del receptor (**Figura 7C**). Tanto las células si-CTL como las células si-mCAT se transdujeron de forma eficaz con EcoLV, lo que indica que el si-mCAT fracasaba en gran medida en la supresión de la acción del receptor administrado por las vesículas. Esto indica que las microvesículas administraban esencialmente la función del receptor mediante transferencia de proteínas recién preparadas y no de ARNm o ADN de plásmido contaminante.

15 La administración de EcoR mediada por Gesícula depende de pH

Dado que la proteína EcoR transferida es funcional como un receptor viral, esta implica su presencia en la superficie de la célula diana. Sin embargo, debido a la naturaleza de la envoltura de VSV-G, se espera que la fusión entre Gesículas y membrana celular se produzca en los compartimentos ácidos internos, liberando la proteína EcoR dentro de la célula y no en la superficie en la que es funcional.

20 Para aumentar los conocimientos en el mecanismo de la transferencia de EcoR, los inventores trataron células diana 239T con cloroquina (CQ) antes del tratamiento con Gesículas, un método que aumenta la pH endosómica y que se sabe que interrumpe la fusión de la membrana desencadenada por VSV-G. Como se muestra en la **figura 8**, los lentivectores pseudotipados para VSV-G son incapaces de transducir células tratadas con CQ (calle 1) mientras que los lentivectores Ecotrópicos siguen siendo eficaces cuando se usan en 293T tratadas con fármacos que expresan mCAT-1 de forma constitutiva (calle 2). Estos datos ilustran la dependencia de pH. De forma interesante los investigadores muestran que CQ inhibe fuertemente la administración de EcoR por gesículas (calle 3). Dado que la transducción con lentivectores indicadores ecotrópicos no disminuye con CQ, este resultado refleja una insuficiencia mediada por CQ en el mecanismo celular que administra EcoR en la superficie.

30 Teniendo en cuenta estos datos, los inventores proponen un modelo en el que las Gesículas después de su internalización en la célula diana se transportan en los compartimentos endosómicos en los que la fusión de membranas se requiere para liberación de EcoR. Las proteínas, después del destino de muchos receptores endógenos, se podrían reciclar posteriormente hacia la membrana celular.

35 Administración del transactivador TET mediada por gesículas

Además de la administración de proteínas citoplasmáticas y de membrana, los inventores exploraron la capacidad de las Gesículas para empaquetar y administrar factores de transcripción, proteínas expresadas clásicamente en el núcleo. Con este fin se produjeron Gesículas en células 293T cotransfectadas con un plásmido que codifica el transactivador TEToff (desactivado) (tTA), un factor de transcripción sintético que activan la transcripción de su promotor afin, el operador Tet (TEO) y que se puede desactivar mediante introducción de tetraciclina/doxiciclina en el medio de cultivo celular (Gossen *et al.*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 89, 5547-5551 (1992)). A continuación las dosis crecientes de gesículas cargadas con tTA se dejaron en células indicadoras que albergan un casete de expresión formado por el gen eGFP bajo el control del operador Tet. Los resultados que se muestran en la **figura 9** indican que la fluorescencia de la línea celular indicadora se activa con Gesículas de tTA 24 horas después del tratamiento. La señal de fluorescencia aumenta con las dosis de gesícula y alcanzar la dosis más elevada de aproximadamente un 50 % de la señal obtenida en una célula indicadora transfectada con una construcción de tTA. Los inventores observan que la activación de la transcripción en las células tratadas permanece sensible al tratamiento con Doxiciclina. Esto indica que la proteína transactivadora tet se ha empaquetado de forma satisfactoria en Gesículas y transferido una línea celular indicadora.

Eficacia de la transferencia de tTA mediada por Gesícula como una función del tiempo de exposición

55 La línea de células indicadoras HEK, Teo-GFP, se sembró en placas de 12 pocillos (10^5 células) y se trataron con gesículas de tTA (50 µg de proteína total por pocillo). El tiempo de exposición varió de 5 minutos a 4 horas. Después de la exposición, el medio que contenía vesículas se descartó; las células se lavaron con PBS y se mantuvieron en cultivo para un análisis de GFP 24 horas más tarde. La eficacia de la transferencia de tTA aumenta gradualmente con el tiempo de exposición hasta 3 horas que es el tiempo de exposición óptimo (véase la **Figura 10**).

60 Métodos de producción y dosificación de gesículas

Producción y dosificación de EcoR-gesículas

65 Las gesículas humanas se produjeron mediante transfección de células HEK 293T usando el método de fosfato cálcico. Las células se sembraron a 3×10^6 células en placas de 10 cm y se cotransfectaron con 15 µg de un

plásmido codificante de VSV-G y 15 µg del plásmido codificante de mCAT-1 por placa. El medio de transfección se reemplazó 24 h más tarde por medio recién preparado que contenía ATP (100 µM) y el sobrenadante que contenía vesículas se recogió 48 horas y 72 horas después de la transfección, se convino, se filtró a través de un filtro de 0,45 µm, y se ultracentrifugó durante 1 h 30 en un rotor SW41 a 25000 rpm (110000 g). Como alternativa la concentración se puede realizar a 4500 g durante 10 horas. Por último el material granulado se volvió a suspender en PBS cedió dando como resultado una concentración de 200 veces.

Se realizaron grandes preparaciones usando seis placas de 10 cm y se generaron aproximadamente 400 µl de 200X vesículas.

Se produjeron vesículas portadoras de YFP/CD81 mediante transfección de 15 µg de plásmido VSV-G en células HEK-293T transducidas previamente mediante un lentivector de expresión de YFP.

Para cuantificar la cantidad de proteínas en microvesículas sedimentadas, los inventores desarrollaron un ensayo de ELISA que detectaba la proteína mCAT-1 etiquetada. En resumen, las diluciones en serie de vesículas se sometieron a lisis en PBS/Triton X100 a un 2 % y se revistieron durante una noche en una placa de 96 pocillos (NUNC.Maxisorp) en un tampón de revestimiento de carbonato (pH 9,6). Las diluciones en serie del péptido flag (Sigma) se revistieron en paralelo en un tampón sin Triton. Las proteínas y el péptido se desvelaron después de 1 h de incubación de la placa lavada con un anticuerpo anti-Flag-HRP diluido a 1/1000 (M2 Sigma) y una revelación final con el sustrato de TMB. Estos ensayos permitieron a los inventores dosificar la cantidad de proteína marcada en la preparación de vesícula.

Como alternativa, los inventores modificaron mediante ingeniería un ensayo de Elisa de VSV-G mediante el revestimiento de diluciones en serie del péptido de VSV-G reconocido por el anticuerpo anti-VSVG acoplado con HRP (P5D4. Sigma). Por lo tanto todas las vesículas de VSV-G se pueden expresar como una masa equivalente de péptido de VSV-G por microlitro de la preparación de vesículas.

Discusión

Aquí los inventores desarrollaron una forma original y sencilla para transferir proteínas citoplasmáticas y de membrana en células humanas mediante el uso de vesículas de tipo exosoma modificadas mediante ingeniería. Esta tecnología de administración de proteína mediada por Vesículas se usó adicionalmente para introducir un factor de transcripción funcional en células humanas. La producción de estas microvesículas se consiguió mediante sobreexpresión de la proteína de interés en células productoras de 293T cotransfectadas con VSV-G. Parece que VSV-G estimula la producción de vesículas a partir de células 293T tal como se revela con el análisis de sobrenadantes enriquecidos proteínas de membrana así como lípidos de membrana y actina (Figura 11). Además, revistiendo las membranas de las microvesículas, la proteína G fusogénica aumenta su capacidad de ponerse en contacto con las células diana y permite una fusión muy eficaz entre partículas y membranas celulares, un requisito previo para la liberación del contenido de la microvesícula en las células diana.

Ejemplo 2

Transferencia de proteína mediada por vesícula en un experimento de cocultivo a través de inserciones de tamaño de poro de 3 µm.

Los inventores cultivaron, en el mismo medio, células HEK transfectadas mediante diversas combinaciones de plásmido, junto con la línea de células indicadoras Teo-GFP. Las células se separaron con un filtro con un tamaño de poro de 3 µm tal como se representa, las células productoras en la parte inferior de una placa de 6 pocillos y en la línea celular indicadora en la inserción de la parte superior. Las células productoras se cotransfectaron con un plásmido de expresión de tTA además de con un ADN vehículo, el plásmido codificante de VSV-G o un VSV-G con defecto de fusión. Después de 48 horas de cocultivo, las inserciones se retiraron y la línea de células indicadoras se sometió a tripsina y se analizó mediante FACS para evaluar la administración de tTA. Los resultados se proporcionan como la MFI en la línea de células Teo-GFP (Figura 12).

Esta técnica permite la administración de proteínas en células diana, sin la necesidad de una etapa de concentración. Las vesículas concentradas pueden ser tóxicas dependiendo del tipo de célula diana. Las células diana se pueden cultivar en las de la parte superior o de la parte inferior y se infunden varios días con células productoras de vesículas para una administración de proteína constante. Las infusiones sucesivas se pueden realizar incluso si se tienen que introducir varios factores secuencialmente mediante transferencia fácil de la inserción en otro baño que contiene vesículas.

Ejemplo 3

Producción y dosificación de microvesículas de células de insecto

La producción de baculovirus se realizó usando el sistema de expresión de Baculovirus Bac-to-Bac (Invitrogen) de

acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, los ADNc de interés se exploraron en la lanzadera pFAST-1 antes de recombinación en bacterias DH10-BAC. Los ADN de Baculovirus se usaron a continuación para transfectar células SF-9 para generar la primera reserva de baculo recogida 72 horas después (pase 1). Esta reserva policlonal se amplificó adicionalmente para alcanzar una titulación de 1×10^7 pfu/ml (pase 2) que se almacenó a 4 °C y se usó producción de vesículas.

Las microvesículas de células de insecto se produjeron después de infección con baculovirus (MOI 0,5-1) de 200×10^6 células HIGH5 cultivadas en suspensión a 30 °C con agitación en 100 ml de medio Express-five SFM suplementado con Glutamina (20 mM) y Penicilina-Estreptomicina (25 U de penicilina, 25 µg de Estreptomicina/ml). 48 horas después de la inoculación, el medio se cosechó, se aclaró y se filtró dos veces a través de un filtro con un tamaño de poro de 0,45 µm antes de ultracentrifugación en un rotor SW-32 a 24000 rpm (100.000 g). A continuación el material sedimentado se volvió a suspender en PBS frío (100X de concentración) y se almacenó a -80 °C.

Para una mejor purificación, esta preparación turbia se dejó en un gradiente de iodixanol discontinuo para permitir la separación de fracciones de densidad discreta. El análisis biológico de las fracciones desveló que las vesículas activas eran capaces de transferir proteínas albergadas sedimentadas a una densidad entre 1,09-1,11. Se prepararon vesículas altamente purificadas después de combinación de estas fracciones y después de una última etapa de concentración de la combinación suplementada con PBS frío (1 h a 30000 rpm en SW41).

Las vesículas obtenidas a partir de células de insectos se cuantificaron con el kit de detección de PAP50 fosfolipídico-enzimático (Biomérieux) y con el ELISA de VSV-G que se ha descrito anteriormente.

Caracterización de microvesículas obtenidas a partir de células de insecto

Las microvesículas de GFP se produjeron como se ha descrito después de la infección de células sf9 células durante 72 h con un baculovirus recombinante. Después de concentración, las vesículas se dejaron en un gradiente de iodixanol y se centrifugaron a 215000 g durante 10 h para permitir sedimentación de las vesículas de acuerdo con su densidad. A continuación las fracciones se recogieron desde la parte inferior del tubo y su densidad se midió mediante pesada. El gradiente de densidad se puede observar en el gráfico de la **Figura 13 A**, que varía de $d = 1,3$ a 1,05. Todas las fracciones se analizaron mediante un fluorómetro para detectar GFP (Exc 485 Em 515) esencialmente detectado en la fracción 21 (barras de color blanco en la **Figura 13 A**). Las diluciones de las fracciones también se usaron para infectar células sf9 para identificar cuando sedimentaba el Baculovirus de GFP. Tris días después de la infección, las células sf9 se analizaron mediante FACS y la titulación de Baculovirus se calculó. Los resultados que se proporcionan en A (barras de color negro) indicaron que el virus sedimentó entre la fracción 13 y la fracción 20 con un máximo para la fracción 16. Los inventores también usaron las fracciones para administrar GFP en células humanas y para analizar la transferencia de fluorescencia 24 h después (**Figura 13 B**). De forma interesante, los inventores encontraron que la capacidad de transferencia de GFP estaba contenida en las fracciones 14 a 19, solapando en parte las fracciones que contenían el virus.

Ensayo de neutralización (NA) de microvesículas de insecto tTA.

Las microvesículas de tTA se produjeron en células High5 infectadas con un baculovirus de tTA. Las vesículas se concentraron y se volvieron a suspender en PBS y se diluyeron 10 veces para el ensayo realizado en 100 µl de PBS. Se incubaron 0,5 eq de Fosfolíp tTA durante 2 horas a 37 °C con diluciones en serie de anticuerpo anti gp64 (clon AcV1) o anticuerpo de control. A continuación las vesículas se dejaron en una célula indicadora de tTA de HEK (que expresa GFP una vez que tTA se introduce en la célula). 24 horas más tarde, las células expuestas a vesículas se analizaron con FACS y la expresión de GFP se cuantificó. Los resultados (véase la **Figura 14**) se proporcionan como la MFI de la población global.

Respuesta a la dosis usando microvesículas de insecto tTA.

Las microvesículas de insecto tTA se concentraron y se purificaron como se ha descrito anteriormente y se almacenaron a -80 °C. El aumento de las dosis de las vesículas se usó para administrar tTA en una línea de células indicadoras de tTA de HEK, dando como resultado un aumento de la señal de GFP detectada en células diana 24 horas después de las vesículas. Las células tratadas con doxiciclina mostraron fondo de fluorescencia, lo que refleja la capacidad inducción esperada del sistema TET (véase la **Figura 15**).

Discusión

Los inventores han encontrado que la producción de vesículas obtenidas a partir de células humanas se consiguió después de cotransfección de células productoras con el plásmido codificante de VSV-G y otro plásmido que codifica la proteína de interés (YFP, mCAT-1, tTA...). Para aumentar el rendimiento del sistema de producción, los inventores construyeron baculovirus recombinantes que codifican VSV-G y tTA y células de insecto infectadas altamente permisivas con respecto a infección por baculovirus. Además las células High5 y las células SF9 se pueden cultivar fácilmente en suspensión hasta 2×10^8 /ml sin suero o incluso en medios sintéticos desprovistos de producto animal. En particular, los baculovirus no se replican en células humanas y la expresión que conduce al promotor de polihedrina del transgén es específica de célula de insecto y no es activa en células humanas.

Los inventores encontraron que después de la coinfección con tTA y VSVG, las células de insecto produjeron microvesículas capaces de transferir tTA en células humanas. Los inventores también encontraron que VSV-G era útil pero prescindible en este proceso, lo que sugiere que otra proteína de fusión no podría sustituir. Este papel podría ser asumido por gp64, la glicoproteína de envoltura de Baculovirus que se expresan todas las células infectadas. Realizando un ensayo de neutralización, los inventores han mostrado que la administración de la proteína mediada por microvesículas de insecto se podría neutralizar con un anticuerpo gp64.

Para caracterizar adicionalmente vesículas de célula de insecto, los inventores dejaron vesículas de insecto GFP en un gradiente de iodixanol para medir su densidad. Este proceso permite la separación de diferentes materiales presentes en una mezcla de acuerdo con su respectiva densidad. Este experimento indicó que la fracción que contiene vesículas se solapaba con las fracciones que contenían baculovirus. Normalmente se admite que el baculovirus no se puede replicar en células humanas, sin embargo los inventores pueden imaginar que una ligera expresión de baculovirus codificantes de tTA podría producir eficiente tTA como para activar la expresión de GFP en las células diana indicadoras. Para comprobar esto, los inventores colocaron el promotor de polihedrina específica de insecto (pH) mediante el promotor de CMV o el de EFla en el plásmido lanzadera (pFAST) usado para construir el Bac recombinante (construcciones representadas en la **Figura 16 A**). A diferencia de pH, esos promotores son altamente activos en células humanas tal como se desveló mediante un experimento de transfección en la línea de células indicadoras de GFP de HEK-Teo (**Figura 16 B**). A continuación los inventores eligieron el promotor de CMV para generar dos baculovirus recombinantes (CMV1 y CMV2) amplificados posteriormente y usados para infectar en células sf9. Ambos CMV recombinantes infectaron las células sf9 de una manera tan eficaz como el pH recombinante. Esto se desveló mediante un análisis de transferencia de Western realizado en lisados de células productoras (**Figura 16 C**). La proteína gp64 de baculovirus se detectó claramente en lisados celulares independientemente de la naturaleza del promotor usado. Después de la preparación de las microvesículas, los inventores realizaron la misma tinción en lisados de microvesículas y se verificó que gp64 se detectaba en gran medida en las tres muestras, lo que muestra el reemplazo de CMV fluía de forma significativa ni en la infección con baculovirus en sf9 ni la liberación del virus. Como se esperaba, los inventores encontraron que el pH recombinante expresaba niveles más elevados de tTA en células sf9 en comparación con los dos CMV recombinantes. Esto lógicamente tenía un impacto en la cantidad de tTA detectada en microvesículas, considerablemente más elevada en los lisados de pH. Por último el aumento de las dosis de microvesículas de pH-tTA y CMV-tTA se aplicó sobre la línea de células HEK-TeoGFP. El MFI que refleja la eficacia de la administración de tTA se analizó con FACS 24 h más tarde desvelando que las vesículas producidas con el pH recombinante eran diez veces más eficaces que las producidas con los CMV recombinantes (**Figura 16 D**). Esto muestra que una transferencia de tTA eficaz se correlaciona con niveles elevados de expresión de proteína en las células productoras. Esto apoya la hipótesis de que la propia proteína es transmitida por microvesículas asociadas a baculovirus. Además, el aumento del rendimiento de transcripción del baculovirus de tTA en la célula humana por intercambio de promotor no aumenta la disponibilidad de tTA en la diana, lo que muestra que la transcripción dirigida por Baculovirus no es responsable (o está muy poco implicada) de la función del tTA administrado. En general estos datos muestran que la transferencia de tTA en células humanas se consigue con microvesículas de gp64 obtenidas a partir de células de insecto y no mediante baculovirus codificantes.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una microvesícula secretada por una célula eucariota, en la que dicha microvesícula comprende una proteína de fusión de la membrana viral VSV-G y una proteína de interés, en la que dicha microvesícula no contiene ninguna proteína estructural viral, y en la que dicha proteína de interés no se une con enlace covalente a dicha proteína de fusión de la membrana viral VSV-G.
- 10 2. La microvesícula de la reivindicación 1, que es una vesícula de tipo exosoma que tiene un tamaño entre 40 y 150 nm.
3. La microvesícula de la reivindicación 1, que es una vesícula de tipo exosoma que tiene una densidad entre 1,08 g/ml y 1,12 g/ml.
- 15 4. La microvesícula de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, obtenida por la filtración y ultracentrifugación de sobrenadantes celulares de células eucariotas, en la que dichas células eucariotas se han transfectado para sobreexpresión transitoria de dicha fusión de la membrana viral VSV-G y dicha proteína de interés, y en la que dicha célula eucariota no expresa ninguna proteína estructural viral y dicha proteína de interés no se une con enlace covalente a dicha proteína de fusión de la membrana viral VSV-G.
- 20 5. Un método *in vitro* para administrar una proteína de interés en una célula diana que comprende la etapa de poner en contacto dicha célula diana con microvesículas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
- 25 6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dichas microvesículas se producen *in situ*, mediante cocultivo de las células diana con las células productoras de microvesículas.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, en el que varias proteínas de interés diferentes se administran en una célula diana poniendo en contacto dicha célula diana con varias microvesículas diferentes de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 4 que comprende dichas varias proteínas de interés diferentes.
- 30 8. El método de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, en el que dicha proteína de interés es un receptor de membrana.
9. El método de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, en el que dicha proteína es un factor de transcripción.
- 35 10. Un uso *in vitro* de una microvesícula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para expresar de forma transitoria una función de proteína de interés en una célula eucariota.
- 40 11. Un método *in vitro* para hacer que una célula diana sea transitoriamente permisiva con respecto a una partícula viral ecotrópica que comprende la etapa de administrar un receptor viral ecotrópico (EcoR) a dicha célula diana mediante una microvesícula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que dicha microvesícula comprende una proteína de fusión de la membrana viral y dicho receptor viral ecotrópico (EcoR).

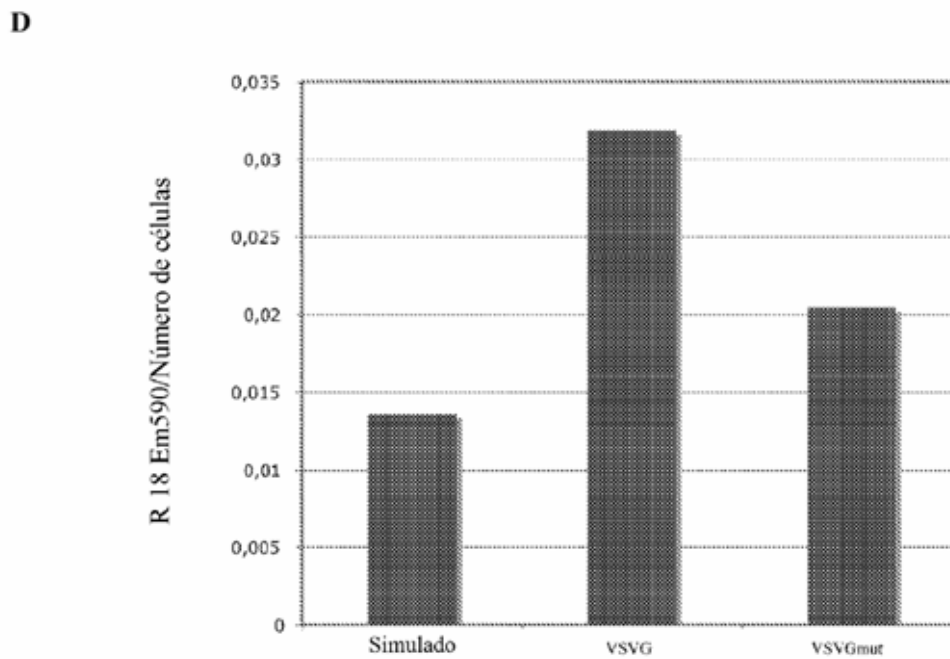
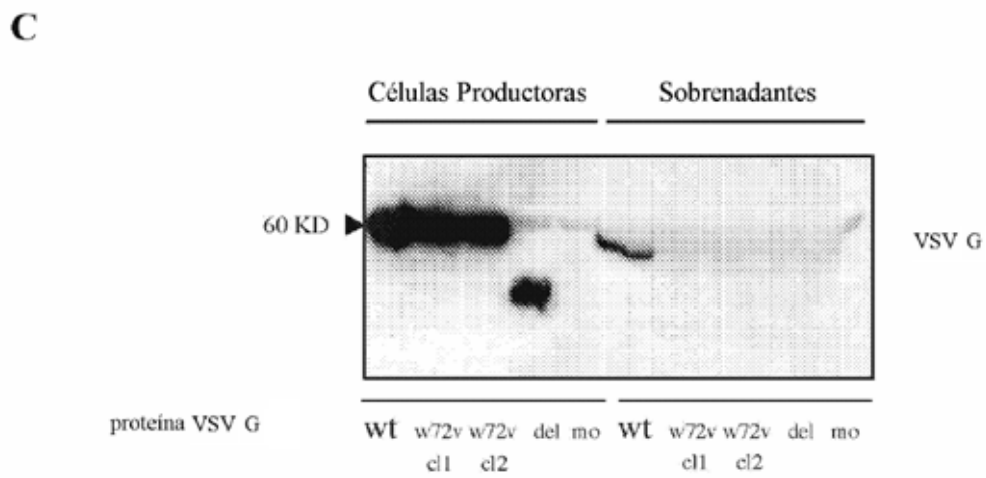
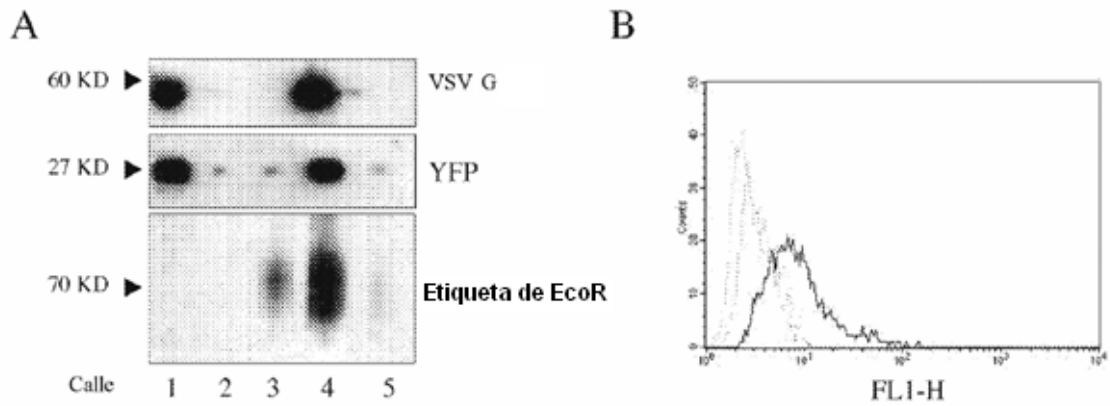


Figura 1

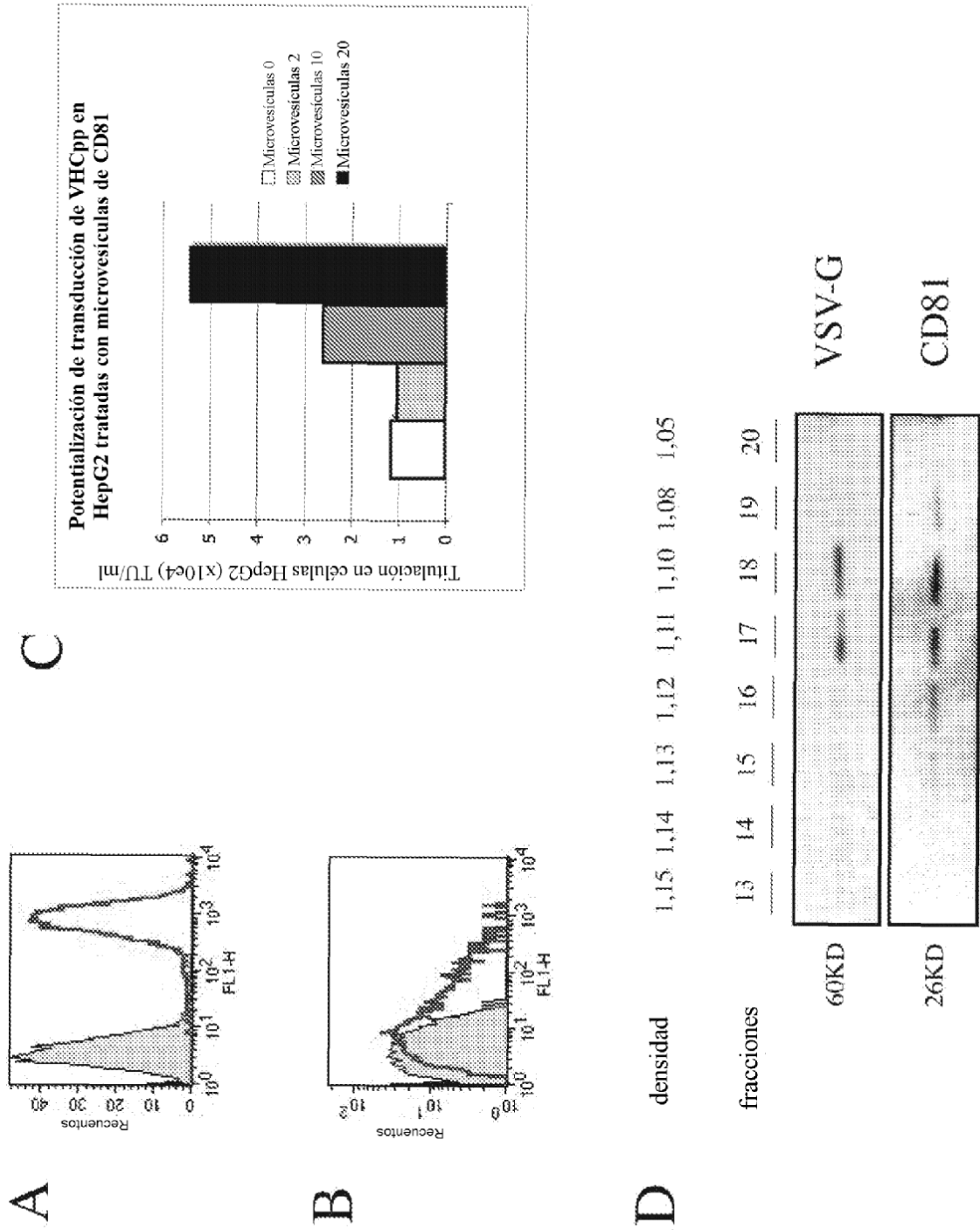
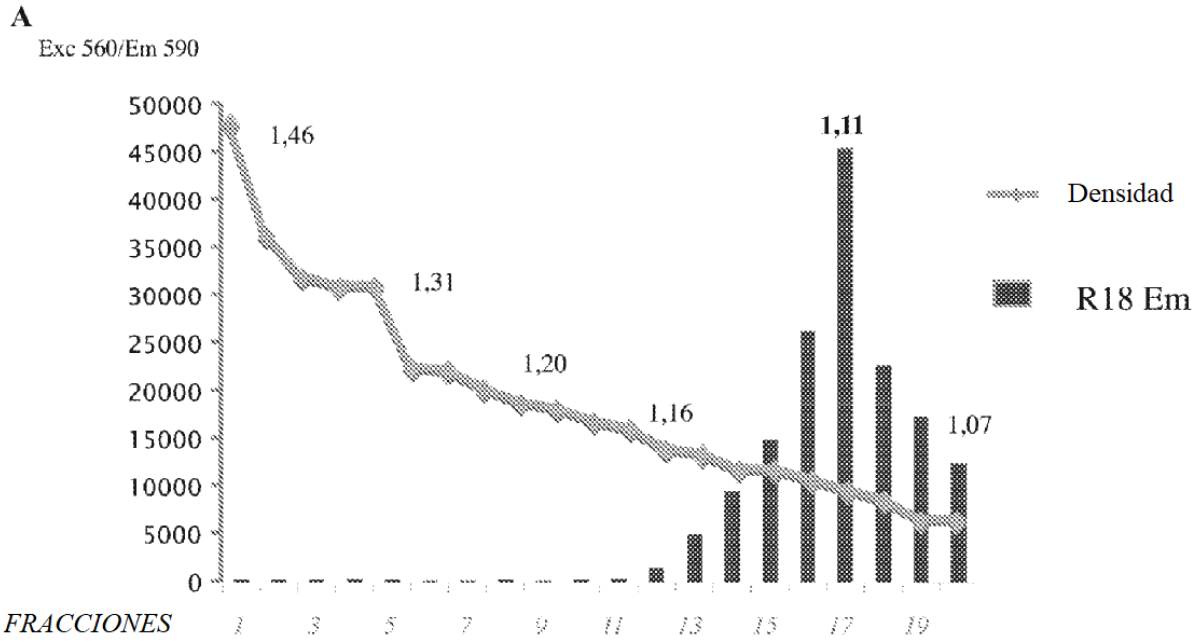


Figura 2



B

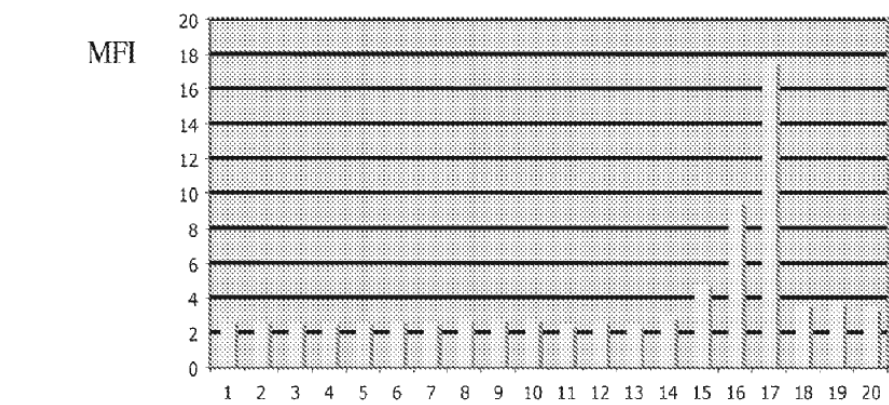
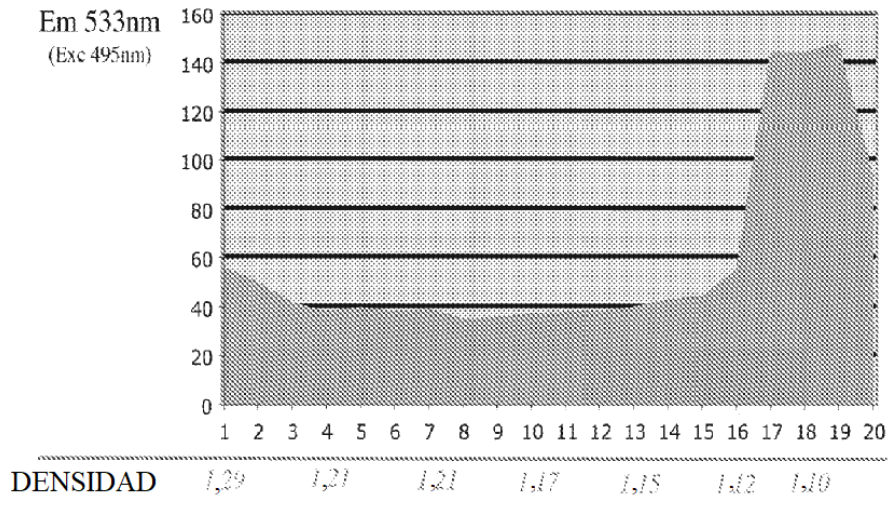


Figura 3

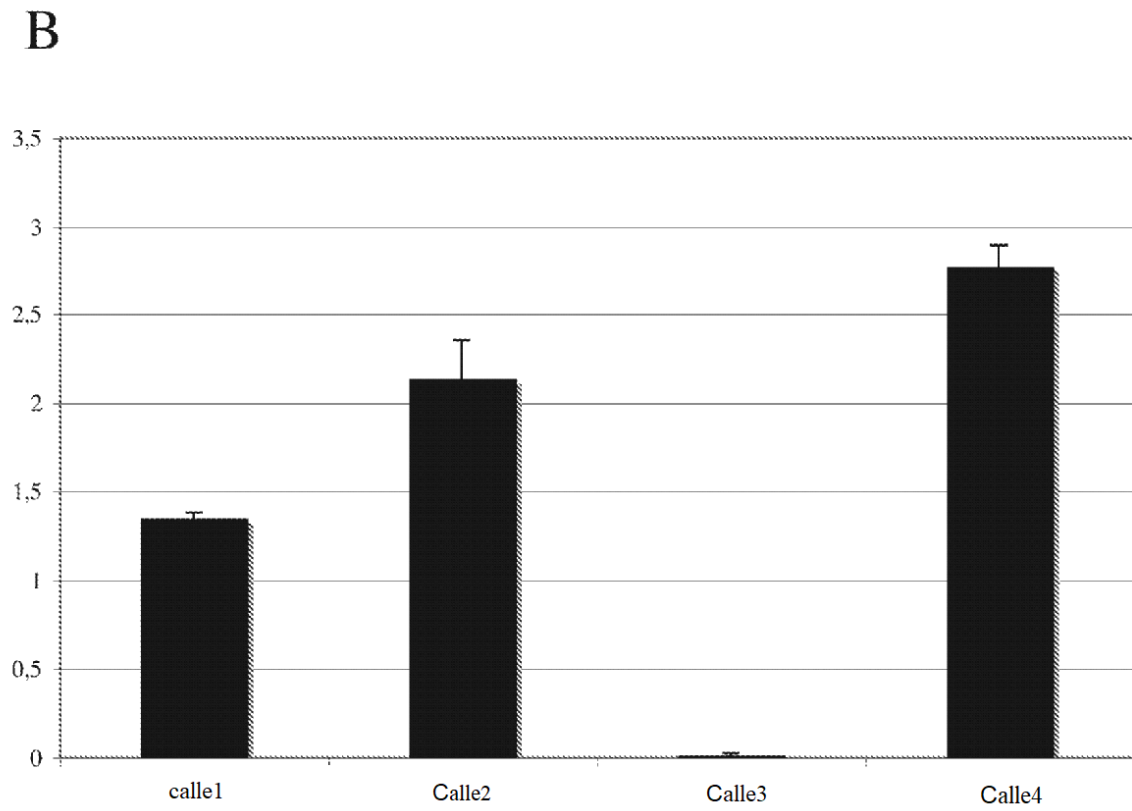
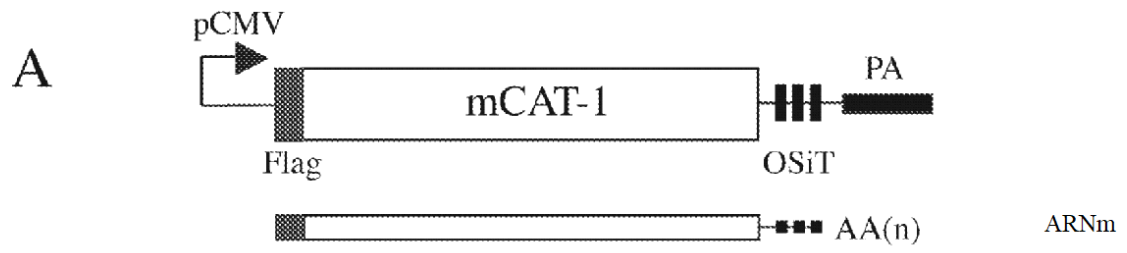


Figura 4

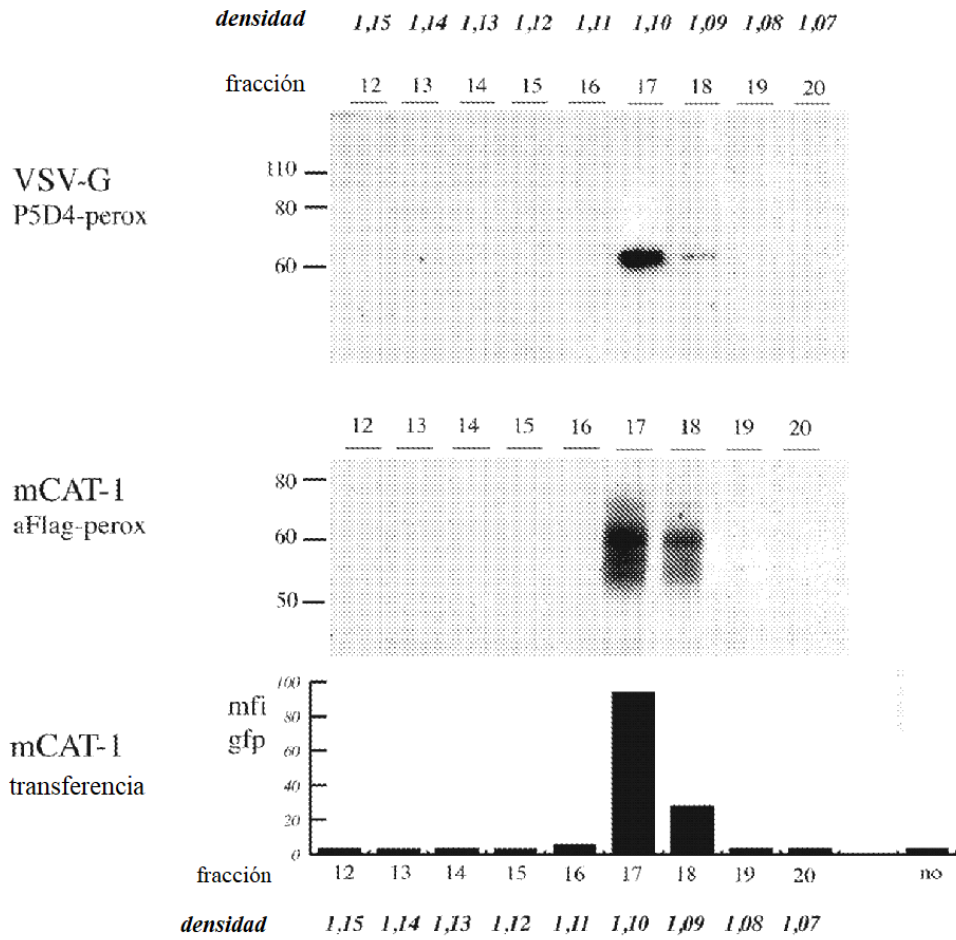


Figura 5

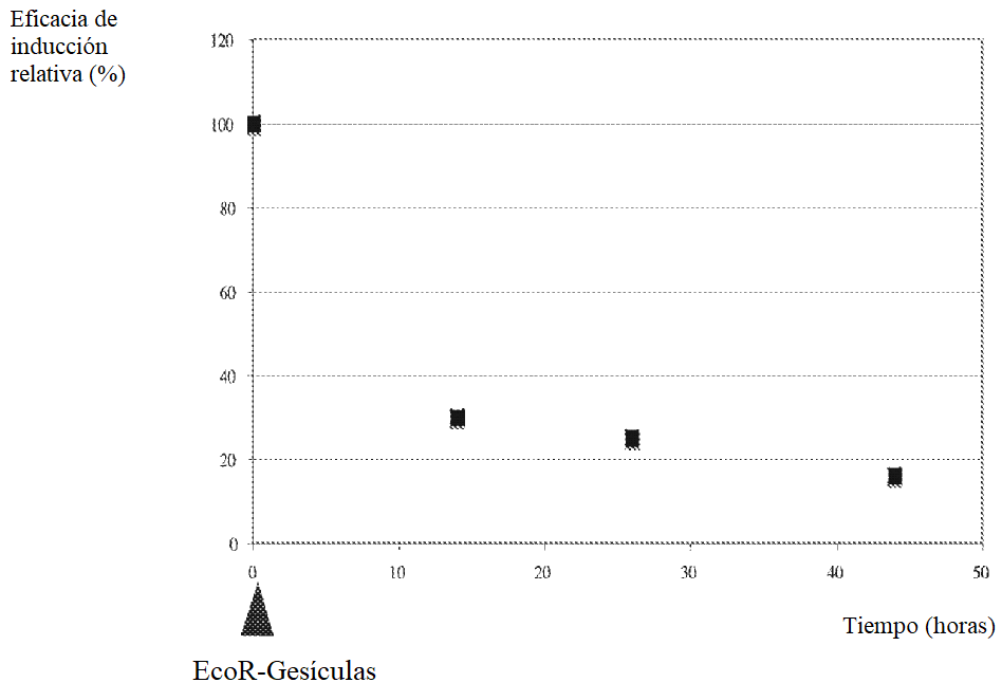


Figura 6

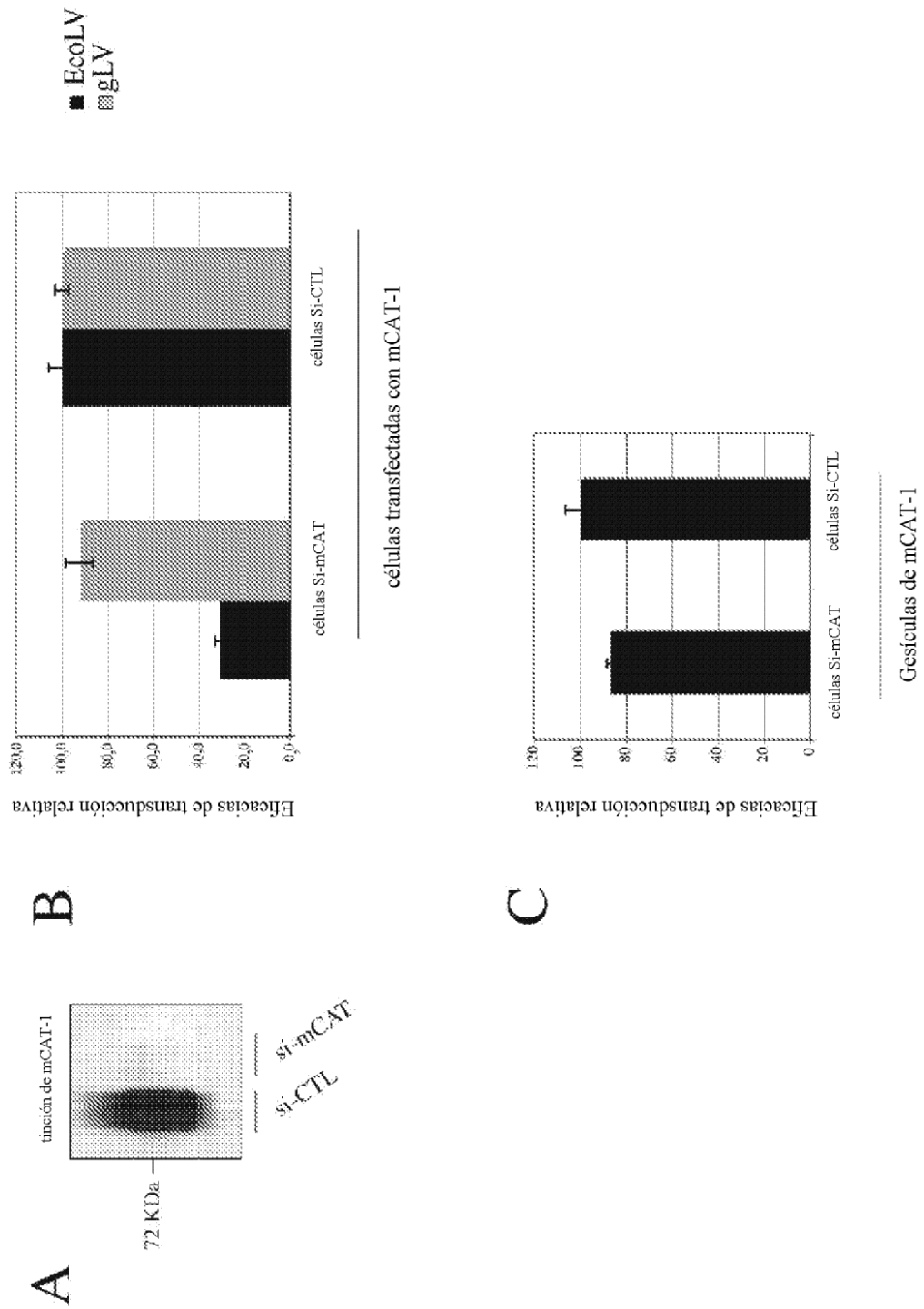


Figura 7

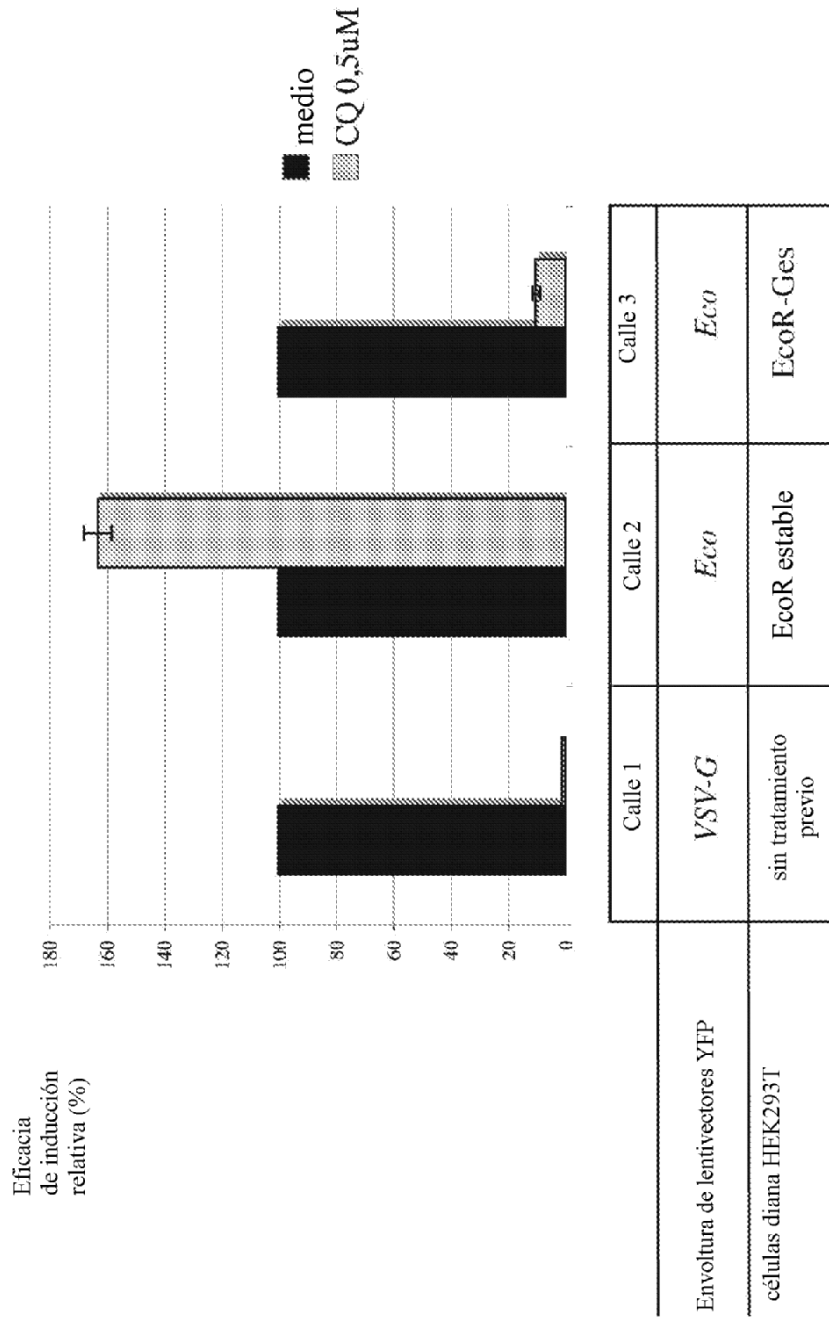


Figura 8

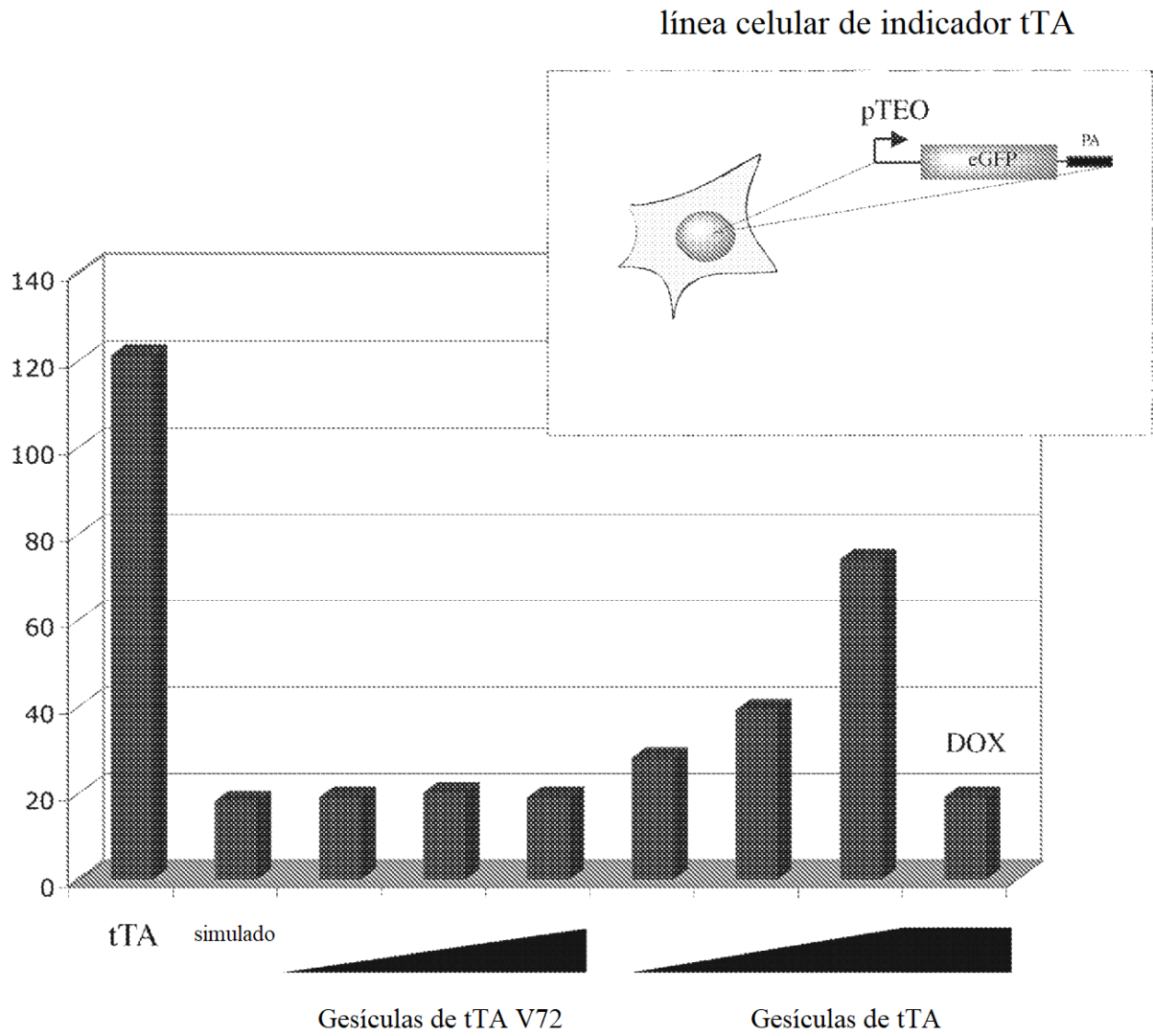


Figura 9

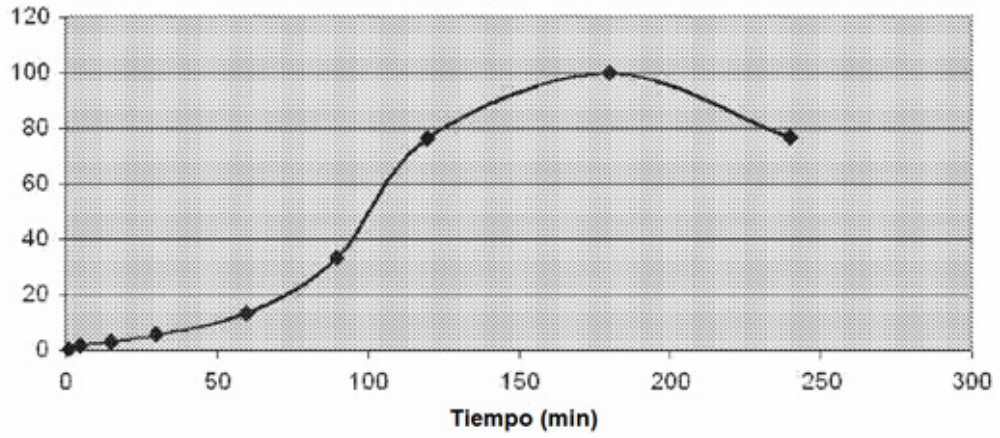
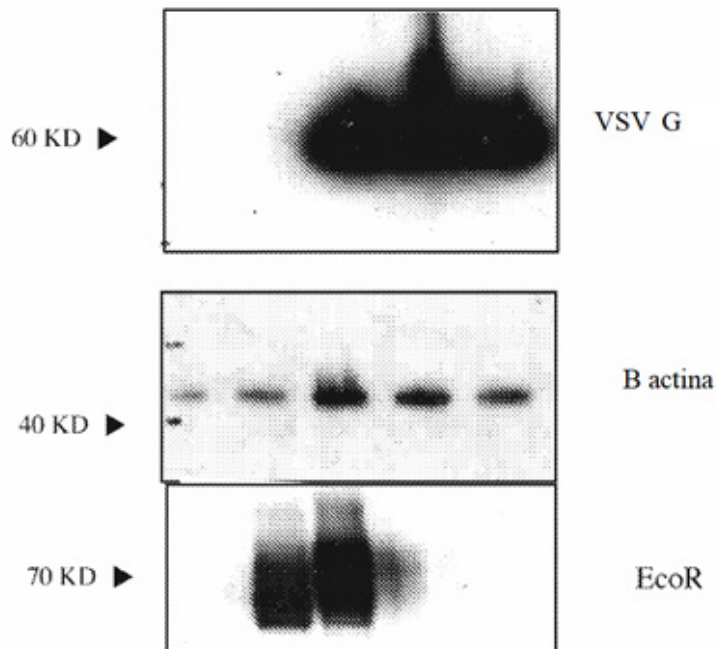


Figura 10

VSVG	-	-	+	+	+
EcoR	-	+	+	-	-



VSVG	-	-	+	+	+
EcoR	-	+	+	-	-

Figura 11

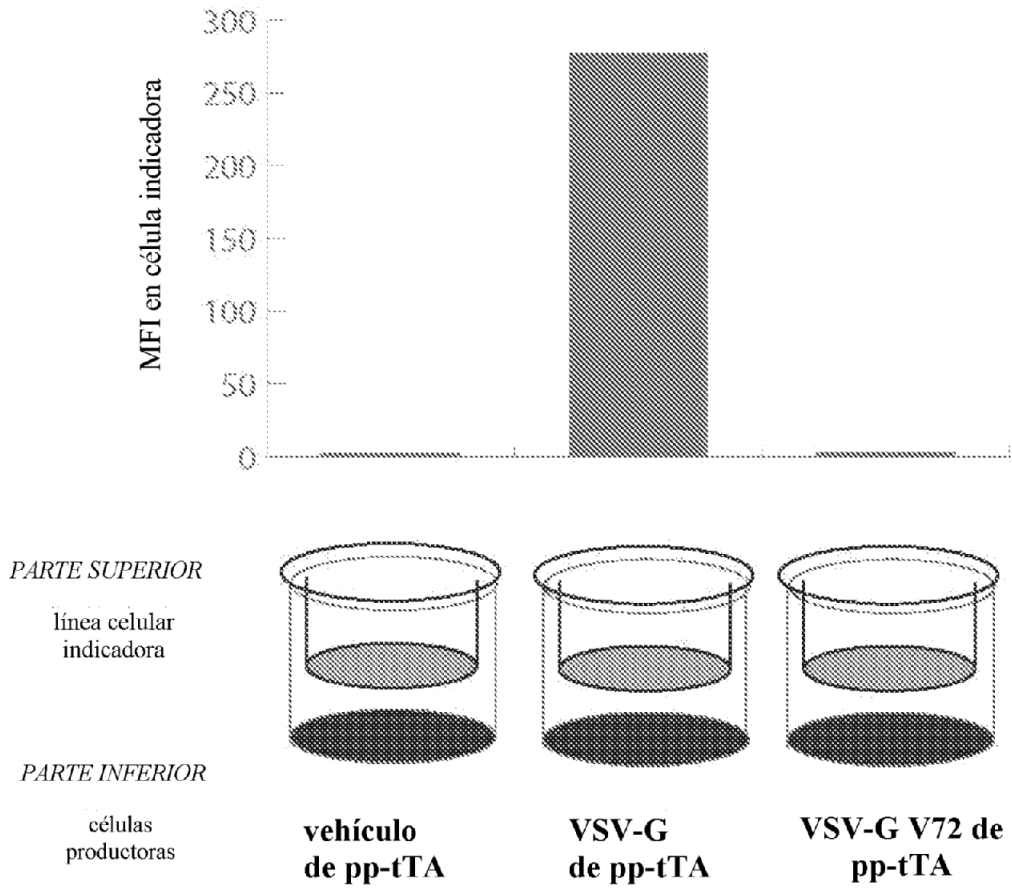


Figura 12

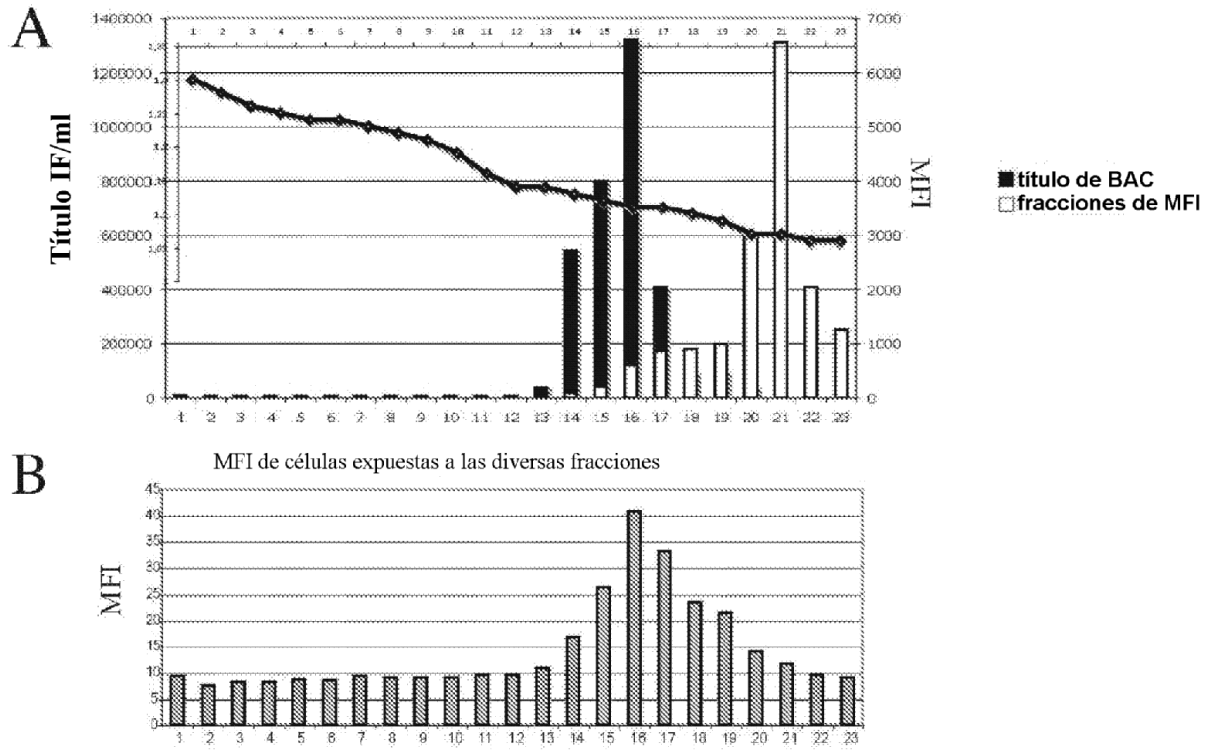


Figura 13

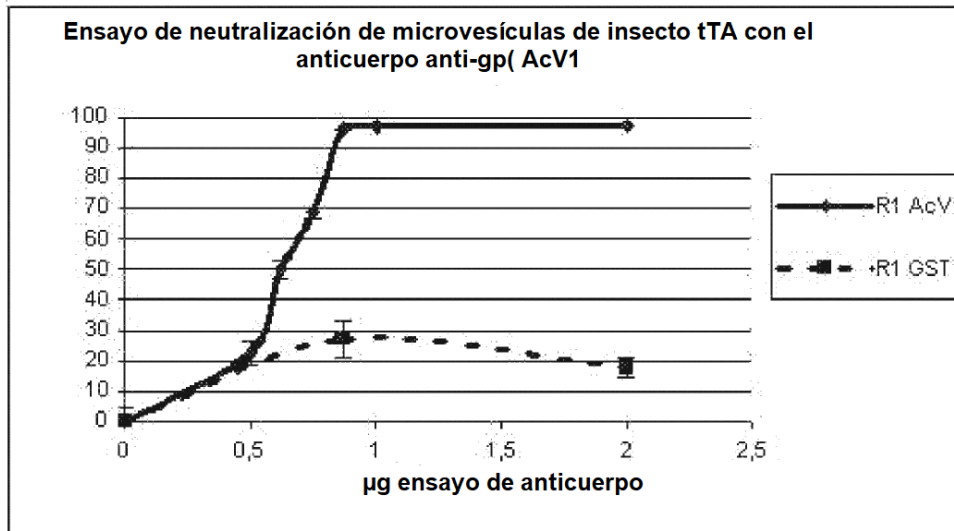


Figura 14

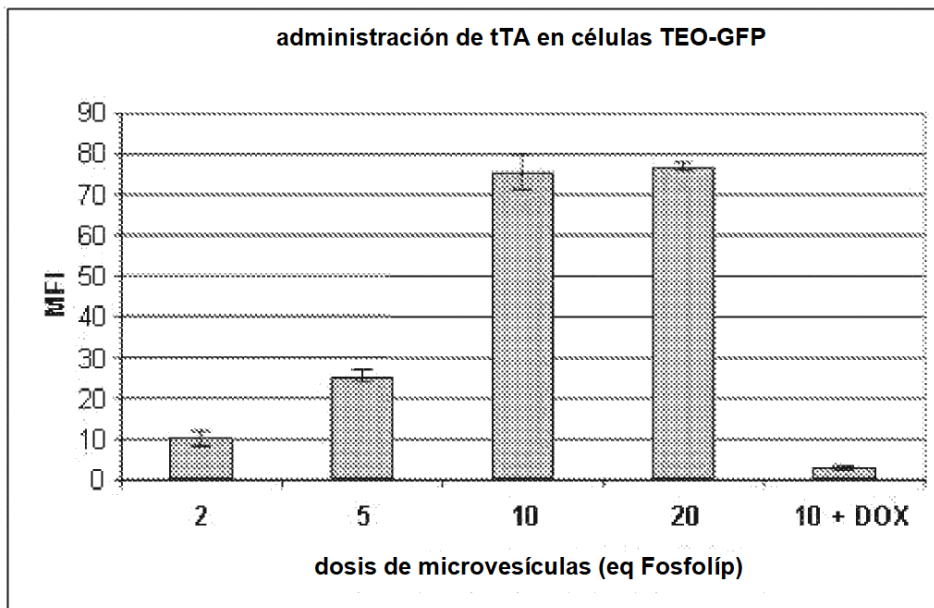


Figura 15

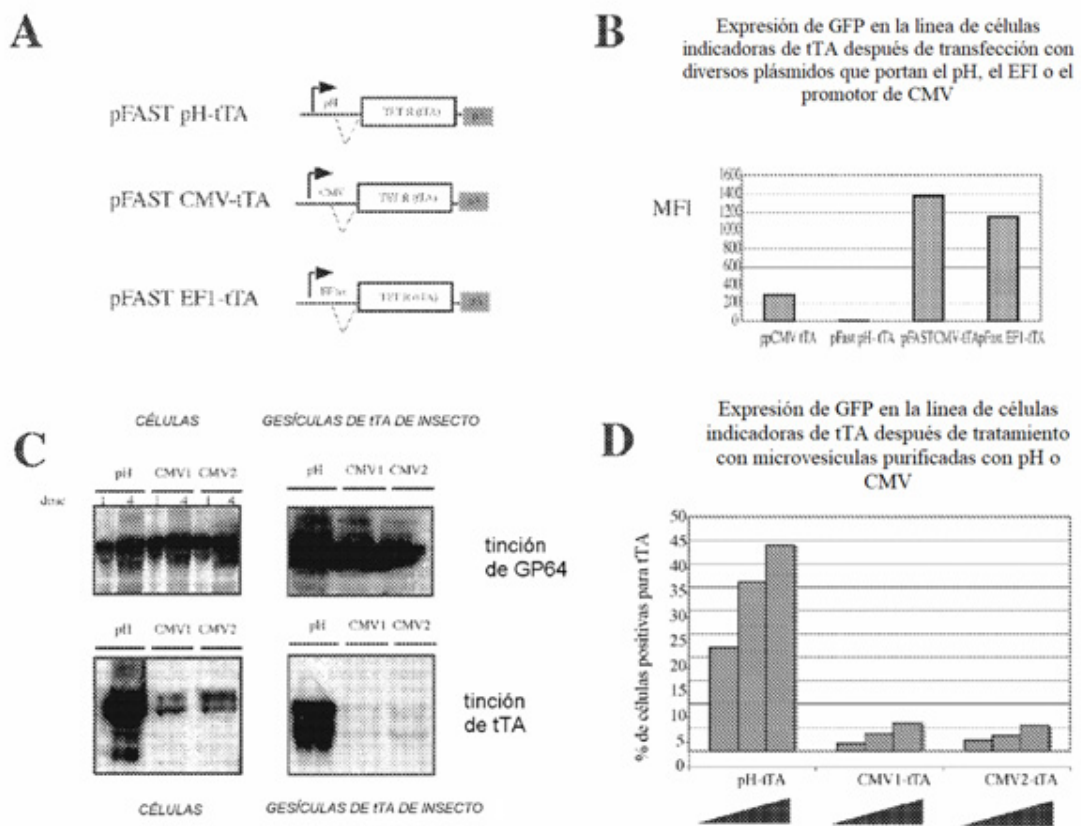


Figura 16