

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 761 638**

51 Int. Cl.:

C12N 7/00 (2006.01)

C12N 15/867 (2006.01)

C07K 14/145 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.01.2015 PCT/EP2015/050337**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.07.2015 WO15104376**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.01.2015 E 15700128 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2019 EP 3092306**

54 Título: **Vectores lentivirales pseudotipados**

30 Prioridad:

10.01.2014 EP 14150846

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.05.2020

73 Titular/es:

**SIRION BIOTECH GMBH (50.0%)
Am Klopferspitz 19
82152 Planegg/Martinsried, DE y
HELMHOLTZ ZENTRUM MÜNCHEN -
DEUTSCHES FORSCHUNGSZENTRUM FÜR
GESUNDHEIT UND UMWELT (GMBH) (50.0%)**

72 Inventor/es:

**ANASTASOV, NATASA;
HÖFIG, INES y
THIRION, CHRISTIAN**

74 Agente/Representante:

ILLESCAS TABOADA, Manuel

ES 2 761 638 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vectores lentivirales pseudotipados

5 **Sumario de la invención**

La presente invención está definida por las reivindicaciones.

La presente invención se refiere a una partícula de vector lentiviral pseudotipada con

10 (a) una proteína de fusión de glicoproteína de la envuelta del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G) ligada a un dominio de unión a la membrana celular, estando dicha proteína de fusión codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende o que consiste en, en el sentido de 5' a 3',

15 (i) un primer segmento de secuencia que codifica para una secuencia señal de retículo endoplasmático (RE);

(ii) un segundo segmento de secuencia que codifica para dicho (poli) péptido que comprende o que consiste en un dominio de unión a la membrana celular que puede unirse directamente a una membrana celular conectando de ese modo una partícula viral que expresa la proteína de fusión de la invención a una célula diana que va a transducirse por la partícula viral;

(iii) un tercer segmento de secuencia que codifica para un enlazador (poli) péptido flexible de al menos 3 aminoácidos de longitud; y

25 (iv) un cuarto segmento de secuencia que codifica para dicha VSV-G; y

(b) una VSV-G nativa;

30 en la que la razón de la proteína de fusión de VSV-G de (a) con respecto a la VSV-G nativa de (b) está en el intervalo de aproximadamente el 10% : aproximadamente el 90% a aproximadamente el 50% : aproximadamente el 50%, en la que el término "aproximadamente" es una desviación con respecto a estos porcentajes de hasta el 5%.

Además, la invención se refiere a un método de producción de la partícula de vector lentiviral pseudotipada de la invención tal como se define por las reivindicaciones. Además, la invención se refiere a un método para transducir una célula así como a un kit tal como se define por las reivindicaciones.

35

Antecedentes

40 Los vectores de expresión lentivirales proporcionan una expresión génica estable y se han convertido en herramientas importantes para la investigación y las aplicaciones terapéuticas génicas. Permiten la integración de genes de interés en el genoma de una amplia gama de células diana tanto en división como no en división [1]. Los vectores gammaretrovirales y lentivirales se han utilizado con éxito en varios ensayos clínicos de terapia génica. Se espera que las aplicaciones clínicas de lentivirus autoactivantes de tercera generación con un perfil de seguridad potenciado aumenten en número con el éxito reciente notificado para la terapia génica de la inmunodeficiencia combinada grave (SCID) y en la terapia tumoral para la transferencia de receptores de células T quiméricas [2-5].

50 Los vectores de lentivirus a menudo se someten a pseudotipado con glicoproteína de la envuelta del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G), que se une al receptor de LDL expresado de forma ubicua [6]. Los vectores de lentivirus pseudotipados de VSV-G poseen una estabilidad mecánica superior, lo que permite la espinoculación y la producción de reservas de vectores de alto título [7]. La proteína de VSV-G se dirige al retículo endoplasmático mediante una secuencia señal (SS), donde se glicosila y forma trímeros que posteriormente se integran en la membrana celular. Las alteraciones en la estructura de la proteína de VSV-G comúnmente conducen a un procesamiento inapropiado y a lentivirus inestables [8].

55 A pesar de los avances en los métodos para la transducción celular, se han notificado bajas tasas de transducción para varios tipos de células, por ejemplo, células de linaje linfóide incluyendo células T primarias y células de linfoma, y algunas líneas de células epiteliales [4, 9]. Estas bajas tasas de transducción tienen el inconveniente de que conducen a la necesidad de utilizar una gran multiplicidad de infecciones (MOI). Con el fin de aumentar el tiempo de contacto y las tasas de absorción lentiviral, se ha notificado la modificación genética de la envuelta lentiviral de VSV-G para la unión de antígeno específico [10-13]. Los anticuerpos completos o los fragmentos de anticuerpos pueden funcionar como conectores de alta afinidad entre las membranas virales y celulares, abriendo de ese modo la posibilidad de mejorar la eficiencia de la transducción. Sin embargo, los intentos anteriores de fusionar una fusión N-terminal de un scFv con VSV-G, tal como se describe en [14], condujeron a vectores lentivirales deteriorados que perdieron su actividad de transducción. Por tanto, se desarrollaron aproximaciones alternativas que pretendían modificar la superficie de los vectores lentivirales con un dominio ZZ de unión a anticuerpos más pequeño derivado de la proteína A de *Staphylococcus* fusionada con VSV-G [12]. Aunque esta aproximación resultó

65

exitosa *in vitro*, no obstante, es menos ventajoso para el desarrollo de protocolos clínicos porque dos reactivos, el vector lentiviral modificado y los anticuerpos respectivos, deben aprobarse y proporcionarse en calidad clínica y combinarse para formar el agente terapéutico activo.

- 5 Por tanto, a pesar del hecho de que se ha invertido mucho esfuerzo en métodos para establecer medios y métodos alternativos y/o mejorados para transducir células, existe todavía la necesidad de proporcionar tales métodos.

Esta necesidad se aborda mediante la provisión de las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones.

10 **Divulgación detallada**

Se describe en el presente documento una molécula de ácido nucleico que comprende o que consiste en una secuencia de ácido nucleico que codifica para la glicoproteína de la envuelta del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G) unida a un (poli) péptido que comprende o que consiste en un dominio de unión a la membrana celular, comprendiendo dicha secuencia de ácido nucleico, en el sentido de 5' a 3', (a) un primer segmento de secuencia que codifica para una secuencia señal de retículo endoplasmático (RE); (b) un segundo segmento de secuencia que codifica para dicho (poli) péptido que comprende o que consiste en un dominio de unión a la membrana celular; (c) un tercer segmento de secuencia que codifica para un enlazador; y (d) un cuarto segmento de secuencia que codifica para dicha VSV-G.

- 20 Los artículos "un" y "una" se usan en el presente documento para referirse a uno o más (es decir, a al menos uno) de los objetos gramaticales del artículo.

Según la presente divulgación, las moléculas de ácido nucleico, que también se denominan en el presente documento polinucleótidos o secuencias de ácido nucleico, incluyen ADN, tal como ADNc o ADN genómico, y ARN. Se entiende que el término "ARN" tal como se usa en el presente documento comprende todas las formas de ARN incluyendo ARNm, ARNt y ARNr pero también ARN genómico, tal como en caso de ARN de virus de ARN. Preferiblemente, los aspectos que nombran "ARN" se refieren a ARNm. Se incluyen además moléculas imitadoras de ácido nucleico conocidas en la técnica tales como derivados sintéticos o semisintéticos de ADN o ARN y polímeros mixtos, hebras tanto sentido como antisentido. Pueden contener bases de nucleótido derivatizadas o no naturales adicionales, tal como apreciarán fácilmente los expertos en la técnica. Tales moléculas imitadoras de ácido nucleico o derivados de ácido nucleico según la divulgación incluyen ácido nucleico peptídico (PNA), ácido nucleico de fosforioato, ácido nucleico de fosforamidoato, ácido ribonucleico de 2'-O-metoxietilo, ácido nucleico de morfolino, ácido nucleico de hexitol (HNA) y ácido nucleico bloqueado (LNA), un derivado de ARN en el que el anillo de ribosa está limitado por una unión metileno entre el 2'-oxígeno y el 4'-carbono (véase, por ejemplo, Braasch y Corey, *Chemistry & Biology* 8, 1-7 (2001)). El PNA es un mimético de ADN sintético con una estructura principal de amida en lugar de la estructura principal de azúcar-fosfato de ADN o ARN, tal como describen Nielsen *et al.*, *Science* 254:1497 (1991); y Egholm *et al.*, *Nature* 365:666 (1993). Al menos las secuencias de ácido nucleico específicamente mencionadas en las opciones (a) a (d) pueden ser ADN. Además, toda la molécula de ácido nucleico de la divulgación puede ser ADN.

- 45 Las moléculas de ácido nucleico de la divulgación pueden ser de origen natural así como sintético o semisintético. Por tanto, las moléculas de ácido nucleico pueden ser, por ejemplo, moléculas de ácido nucleico que se han sintetizado según protocolos convencionales de química orgánica. El experto en la técnica está familiarizado con la preparación y el uso de tales moléculas de ácido nucleico (véase, por ejemplo, Sambrook y Russel "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (2001)).

- 50 El término comprende, tal como se usa en el presente documento, denota que pueden incluirse secuencias, componentes y/o etapas del método adicionales además de las secuencias, los componentes y/o las etapas del método específicamente mencionados. Sin embargo, este término también abarca que el objeto reivindicado consiste en exactamente las secuencias, los componentes y/o las etapas del método mencionados.

- 55 En aquellos casos en los que la molécula de ácido nucleico comprende (en lugar de que consiste en) la secuencia mencionada, se amplían nucleótidos adicionales a lo largo de la secuencia específica o bien en el extremo 5' o bien en el extremo 3', o ambos. Los nucleótidos adicionales pueden ser de naturaleza heteróloga u homóloga. En el caso de secuencias homólogas, estas secuencias pueden comprender hasta 1500 nucleótidos en el extremo 5' y/o el extremo 3', tal como, por ejemplo, hasta 1000 nucleótidos, tal como hasta 900 nucleótidos, más preferiblemente hasta 800 nucleótidos, tal como hasta 700 nucleótidos, tal como, por ejemplo, hasta 600 nucleótidos, tal como hasta 500 nucleótidos, incluso más preferiblemente hasta 400 nucleótidos, tal como hasta 300 nucleótidos, tal como, por ejemplo, hasta 200 nucleótidos, tal como hasta 100 nucleótidos, más preferiblemente hasta 50 nucleótidos, tal como hasta 40 nucleótidos, tal como, por ejemplo, hasta 30 nucleótidos, tal como hasta 20 nucleótidos, más preferiblemente hasta 10 nucleótidos y lo más preferiblemente hasta 5 nucleótidos en el extremo 5' y/o el 3'. El término "hasta [...] nucleótidos", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un número de nucleótidos que incluye cualquier número entero por debajo y que incluye el número mencionado específicamente. Por ejemplo, el término "hasta 5 nucleótidos" se refiere a cualquiera de 1, 2, 3, 4 y 5 nucleótidos. Además, en el caso de secuencias homólogas, los aspectos no incluyen genomas completos o cromosomas completos. Las secuencias

heterólogas adicionales pueden incluir, por ejemplo, promotores heterólogos que están ligados operativamente a las secuencias codificantes de la divulgación, así como secuencias de ácido nucleico reguladoras adicionales bien conocidas en la técnica y descritas en más detalle a continuación en el presente documento.

5 La secuencia de ácido nucleico comprendida en, o que constituye la molécula de ácido nucleico de la presente divulgación codifica para la glicoproteína de la envuelta del virus de la estomatitis vesicular ligada a un (poli)péptido que comprende o que consiste en un dominio de unión a la membrana celular. Como tal, la secuencia de ácido nucleico y, por tanto, la molécula de ácido nucleico de la presente divulgación, codifican para una proteína de fusión, que también se denomina en el presente documento “la proteína de fusión de la divulgación”.

10 Según la presente divulgación, la molécula de ácido nucleico está constituida por al menos cuatro secuencias tal como se define en las opciones (a) a (d), en la que el orden de estas cuatro secuencias de ácido nucleico es tal como se indica desde 5' hasta 3', es decir, la primera secuencia de ácido nucleico es la de (a), seguida por (b), seguida por (c) que a su vez está seguida por (d). La primera secuencia según la opción (a) es una secuencia de ácido nucleico que codifica para una secuencia señal de retículo endoplasmático (RE). Una secuencia señal de RE es una secuencia peptídica corta presente en el extremo N-terminal de proteínas recién sintetizadas. Tras el comienzo de la traducción de ARNm, esta secuencia es la primera secuencia que va a traducirse y la secuencia señal emergente de la proteína naciente se une a partículas de reconocimiento de señales (SRP). La unión de SRP a la secuencia señal de RE pausa la traducción y conduce a la translocación del complejo SRP-secuencia señal-ARNm-ribosoma al RE, donde la SRP reconoce y se acopla a un receptor en la membrana del RE (RRE). La secuencia señal se inserta posteriormente el RRE y atraviesa la membrana, de modo que la traducción continúa con la cadena polipeptídica emergente introduciéndose en la luz del RE.

25 Los motivos de secuencia de las secuencias señal de RE son bien conocidos en la técnica y se han descrito, por ejemplo, en Lemberg y Martoglio o en Schwartz [45, 46]. Por tanto, el experto es consciente de secuencias señal de RE que se producen de manera natural o está en la posición de generar secuencias señal de RE artificiales, es decir, que no se producen de manera natural, que muestran la funcionalidad descrita anteriormente, que puede emplearse según la divulgación.

30 Preferiblemente, se usan secuencias señal de RE que se producen de manera natural, más preferiblemente una secuencia señal de RE viral o secuencia señal de RE endógena al sistema celular usado para la producción de la proteína de fusión codificada por la molécula de ácido nucleico de la divulgación. En el caso de secuencias señal de RE virales, se prefiere que se origine de *Rhabdoviridae*, más preferiblemente del género *Vesiculovirus*. Lo más preferiblemente, la secuencia señal de RE es la secuencia señal de RE que media de manera endógena la translocación al RE de la VSV-G empleada según la opción (d). El segundo segmento de secuencia según la opción (b) es una secuencia de ácido nucleico que codifica para un (poli)péptido que comprende o que consiste en un dominio de unión a la membrana celular. El término “(poli)péptido” según la presente divulgación se refiere a polipéptidos así como a péptidos. El término “polipéptido”, tal como se usa en el presente documento indistintamente con el término “proteína”, describe cadenas moleculares lineales de aminoácidos, incluyendo proteínas de cadena sencilla o sus fragmentos, que contienen más de 30 aminoácidos, mientras que el término “péptido” tal como se usa en el presente documento describe un grupo de moléculas que consisten en hasta 30 aminoácidos. Los (poli)péptidos pueden formar además oligómeros que consisten en al menos dos moléculas idénticas o diferentes. Las correspondientes estructuras de orden superior de tales multímeros se denominan, correspondientemente, homo o heterodímeros, homo o heterotrímeros, etc. Tales multímeros también se encuentran bajo la definición del término “(poli)péptido”. Los términos “polipéptido” y “péptido” también se refieren a polipéptidos/péptidos modificados de manera natural donde la modificación se efectúa, por ejemplo, mediante glicosilación, acetilación, fosforilación y modificaciones similares que son bien conocidos en la técnica.

50 Según la presente divulgación, la molécula de ácido nucleico codifica para “un (poli)péptido que comprende o que consiste en un dominio de unión a la membrana celular”. El término “membrana celular” y su significado científico en relación con la estructura y función son bien conocidos en la técnica [47, 48] y se usa, por consiguiente, en el contexto de la presente divulgación. El “dominio de unión a la membrana celular” según la presente divulgación puede ser cualquier secuencia de aminoácidos que puede unirse directamente a una membrana celular. Los dominios de unión que sólo se unen indirectamente a la membrana celular por medio de moléculas intermedias se excluyen específicamente.

60 La función del dominio de unión a la membrana celular dentro de la proteína de fusión de la divulgación es actuar como conector entre una partícula viral que expresa la proteína de fusión usada en el presente documento y una célula diana que va a transducirse por dicha partícula viral. Por tanto, se apreciará que un dominio de unión a la membrana celular ha de elegirse que pueda unirse a la membrana celular de la célula diana de interés. Preferiblemente, el dominio de unión a la membrana celular puede unirse a una membrana celular diana de mamífero. Más preferiblemente, el dominio de unión a la membrana celular puede unirse a una membrana celular de una célula diana humana tal como, por ejemplo, células progenitoras, células enfermas, líneas celulares primarias, célula epitelial, células endoteliales, células neuronales, células de linaje linfóide, células madre o células tumorales.

65 El término “unión”, en este contexto, se refiere a la capacidad del dominio de asociarse con la membrana celular, por

ejemplo, por medio de interacciones covalentes o no covalentes. Una interacción “covalente” es una forma de unión química que se caracteriza por compartir pares de electrones entre átomos, o entre átomos y otros enlaces covalentes. La unión covalente incluye muchos tipos de interacción bien conocidos en la técnica tales como, por ejemplo, unión σ , unión π , unión de metal a no metal, interacciones agósticas y enlaces de tres centros y dos electrones. Un enlace “no covalente” es un enlace químico que no implica compartir pares de electrones. Los enlaces no covalentes son críticos en el mantenimiento de la estructura tridimensional de grandes moléculas, tales como proteínas y ácidos nucleicos, y están implicados en muchos procesos biológicos en los que las moléculas se unen específicamente, pero de manera transitoria, entre sí. Hay varios tipos de enlaces no covalentes, tales como uniones hidrógeno, interacciones iónicas, interacciones de Van der Waals, enlaces carga-carga, carga-dipolo, dipolo-dipolo y enlaces hidrófobos. Las interacciones no covalentes a menudo implican varios tipos diferentes de enlaces no covalentes que actúan en conjunto, por ejemplo, para mantener un ligando en posición en un sitio de unión diana sobre la membrana celular. Puede producirse una interacción con un grupo tal como una carga o un dipolo, que puede estar presente muchas veces en la superficie de la membrana celular. Preferiblemente, la interacción (es decir, la unión) se produce en un sitio definido (implica un constituyente/epitopo de membrana celular específico) de la membrana celular, y acompaña la formación de al menos una interacción, preferiblemente la formación de una red de varias interacciones específicas. Incluso más preferiblemente, la unión es específica para la célula diana, es decir, la unión se produce en la membrana celular de la célula diana pero no, o no significativamente, en la membrana celular de una célula no diana.

La estructura del dominio no está limitada siempre que cumpla con la función de unión, preferiblemente, unión específica, a la membrana celular. En la técnica se conocen varios dominios de unión a la membrana celular que incluyen, sin limitación, anticuerpos y fragmentos de los mismos, andamiajes proteicos así como dominios de proteínas con propiedades de unión a células, tales como, a saber, (poli)péptidos derivados de fibronectina [49] y (poli)péptidos con actividad de unión a heparina.

El término “anticuerpo” tal como se usa según la presente divulgación comprende anticuerpos policlonales y monoclonales, así como derivados o fragmentos de los mismos, que todavía conservan su especificidad de unión. Los fragmentos o derivados de anticuerpo comprenden, entre otros, anticuerpos con un solo dominio, Nanobodies, fragmentos de VHH camélidos, y fragmentos de VNAR de peces cartilaginosos, fragmentos de Fab o Fab’ así como fragmentos de Fd, F(ab’)₂, Fv o scFv; véase, por ejemplo Harlow y Lane “Antibodies, A Laboratory Manual”, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988 y Harlow y Lane “Using Antibodies: A Laboratory Manual” Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999. El término “anticuerpo” también incluye anticuerpos quiméricos (dominio constante humano, dominio constante no humano), de cadena sencilla y humanizados (anticuerpo humano con la excepción de CDR no humanas). Preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.

En la técnica se conocen bien y se describen diversas técnicas para la producción de anticuerpos, por ejemplo en Altshuler *et al.*, 2010 (Altshuler EP, Serebryanaya DV, Katrukha AG. 2010, Biochemistry (Mosc.), vol. 75(13), 1584). Por tanto, pueden obtenerse anticuerpos policlonales de la sangre de un animal tras la inmunización con un antígeno en mezcla con aditivos y adyuvantes, y pueden producirse anticuerpos monoclonales mediante cualquier técnica que proporciona anticuerpos producidos por cultivos continuos de líneas celulares. Se describen ejemplos de tales técnicas, por ejemplo en Harlow E y Lane D, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988; Harlow E y Lane D, Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999 e incluyen la técnica de hibridomas descrita originalmente por Kohler y Milstein, 1975, la técnica de triomas, la técnica de hibridomas de células B humanas (véase, por ejemplo, Kozbor D, 1983, Immunology Today, vol.4, 7; ; Li J, Sai T, Berger M, Chao Q, Davidson D, Deshmukh G, Drozdowski B, Ebel W, Harley S, Henry M, Jacob S, Kline B, Lazo E, Rotella F, Routhier E, Rudolph K, Sage J, Simon P, Yao J, Zhou Y, Kavuru M, Bonfield T, Thomassen MJ, Sass PM, Nicolaidis NC, Grasso L., 2006, PNAS, vol. 103(10), 3557) y la técnica de hibridomas de EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole *et al.*, 1985, Alan R. Liss, Inc, 77-96). Además, pueden obtenerse anticuerpos recombinantes a partir de anticuerpos monoclonales o pueden prepararse de nuevo usando diversos métodos de visualización tales como visualización de fagos, ribosómica, de ARNm o celular. Un sistema adecuado para la expresión de los anticuerpos recombinantes (humanizados) puede seleccionarse de, por ejemplo, bacterias, levadura, insectos, líneas celulares de mamífero o animales o plantas transgénicos (véase, por ejemplo, la patente estadounidense 6.080.560; Holliger P, Hudson PJ. 2005, Nat Biotechnol., vol. 23(9), 11265). Además, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla (véase, entre otros, la patente estadounidense 4.946.778) pueden adaptarse para producir anticuerpos de cadena sencilla específicos para la diana de esta divulgación. Puede usarse resonancia de plasmón superficial tal como se emplea en el sistema BIAcore para aumentar la eficiencia de los anticuerpos de fagos. Preferiblemente, el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo anti-EGFR, un anticuerpo anti-CD30, un anticuerpo anti-CD34, un anticuerpo anti-CD3, un anticuerpo anti-CD4, un anticuerpo anti-CD19, un anticuerpo anti-CD20 o un anticuerpo anti-CD44. Más preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo anti-EGFR o un anticuerpo anti-CD30. Se sabe que el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) se expresa de manera predominante en células epiteliales y CD30 se expresa en células de linfoma, respectivamente [15-18]. Están disponibles diversos fragmentos de anticuerpo con altas afinidades contra EGFR y CD30 y se usaron previamente *in vitro* e *in vivo* [19-21]. Preferiblemente, el al menos un reactivo de afinidad puede ser uno de los anticuerpos anti-EGFR o anti-CD30 empleados en los ejemplos. En la técnica se conocen y se han descrito anticuerpos scFv adecuados contra CD30 y EGFR, por ejemplo en Klimka *et al.* [63] y Kettleborough *et al.* [64].

El término “andamiajes proteicos” es bien conocido en la técnica y se refiere a una nueva generación de proteínas receptoras que se derivan de “andamiajes” no-inmunoglobulina pequeños y robustos que pueden equiparse con funciones de unión prescritas usando métodos de diseño combinatorio de proteínas (Gebauer y Skerra (2009) Engineered protein scaffolds next-generation antibody therapeutics. *Curr Opin Chem Biol*, 13, 245-255.). Los ejemplos preferidos, pero no limitativos, de andamiajes proteicos modificados por ingeniería genética son andamiajes proteicos para el desarrollo de candidatos a fármaco para terapia o diagnóstico *in vivo*, e incluyen adnectinas, Affibodies, anticalinas, DARPin e inhibidores de tipo Kunitz modificados por ingeniería genética, tal como se detalla adicionalmente a continuación.

La molécula de ácido nucleico de la opción (b) puede o bien codificar para un (poli) péptido que comprende dicho dominio de unión a la membrana celular o bien puede codificar para un (poli) péptido que consiste en dicho dominio de unión a la membrana celular. En la primera opción, el dominio de unión a la membrana celular forma parte de una molécula mayor, tal como por ejemplo un anticuerpo. En la última opción, el (poli) péptido es *per se* un dominio de unión a la membrana celular. Los ejemplos para esta opción incluyen, sin ser limitativos, los andamiajes proteicos descritos anteriormente en el presente documento. Independientemente de si el dominio de unión a la membrana celular forma parte de una molécula mayor o es *per se* un dominio de unión a la membrana celular se apreciará que forma en cualquier caso parte de la proteína codificada por la molécula de ácido nucleico de la divulgación, es decir que contiene al menos los segmentos adicionales (a), (c) y (d).

El tercer segmento de secuencia según la opción (c) codifica para un “enlazador”. El término “enlazador”, tal como se usa según la presente divulgación, se refiere a una secuela de aminoácidos (es decir, enlazadores peptídicos). Según la presente divulgación, el enlazador se ubica entre la secuencia de aminoácidos codificada por el segundo segmento de secuencia y la secuencia de aminoácidos codificada por el cuarto segmento de secuencia, conectando de ese modo (ligando) estas dos secuencias en la proteína traducida.

El enlazador, tal como se prevé en el presente documento, es un enlazador (poli)peptídico de al menos 3 aminoácidos de longitud. Preferiblemente, el enlazador es de 3 a 100 aminoácidos de longitud, más preferiblemente, el enlazador es de 5 a 50 aminoácidos de longitud e incluso más preferiblemente, el enlazador es de 10 a 20 aminoácidos de longitud. Lo más preferiblemente, el enlazador es de 13 aminoácidos de longitud. En un aspecto alternativo o adicional, el enlazador amplía la distancia del dominio de unión a la membrana celular de la superficie del vector lentiviral a de aproximadamente 5 a 100 Å, más preferiblemente de aproximadamente 5 a 75 Å, e incluso más preferiblemente de aproximadamente 5 a 50 Å. Lo más preferiblemente, el enlazador amplía la distancia del dominio de unión celular a aproximadamente 30 Å. Medios y métodos para determinar la distancia del dominio de unión a la membrana celular de la superficie del vector lentiviral son bien conocidos en la técnica e incluyen, sin ser limitativos, el análisis de estructuras tridimensionales de la proteína de fusión, la predicción de la estructura secundaria/terciaria y el modelado de homología así como alineaciones de secuencia.

Se apreciará que el enlazador sirve para separar físicamente segmentos de ácido nucleico, por ejemplo, los segmentos (b) y (d) de la molécula de ácido nucleico de la divulgación. Tal como se conoce en la técnica, la naturaleza, es decir, la longitud y/o la secuencia de aminoácidos del ligador, puede afectar a la proteína de fusión expresada, por ejemplo, puede modificar o potenciar la estabilidad y/o solubilidad de la proteína de fusión expresada o puede tener efectos estéricos que influyen en las interacciones con otras moléculas o la multimerización. Por tanto, los enlazadores preferidos no deben interferir con el plegamiento y la expresión correcta del polipéptido codificado y la función biológica de la VSV-G y el dominio de unión a la membrana celular, ya que es un requisito previo que el polipéptido de la divulgación mantenga la capacidad de unirse a células diana. Por consiguiente, el enlazador tiene que ser lo suficientemente largo y/o flexible para permitir aún estas propiedades. Por tanto, la longitud y la secuencia de un enlazador puede variarse en función de la composición real, es decir, la elección de los segmentos de secuencia de la molécula de la divulgación. Además, los enlazadores preferidos deben adoptar una conformación flexible y deben tener un mínimo carácter hidrófobo o una mínima carga, para evitar la interacción con los dominios de proteínas funcionales y/o el disolvente. Preferiblemente, el enlazador se elige para ser un resto que puede evitar la detección por el sistema inmunitario. El experto sabe cómo diseñar moléculas enlazadoras apropiadas basándose en su conocimiento común. Por ejemplo, los enlazadores peptídicos pueden elegirse de la base de datos LIP (Loops in Proteins) (Michalsky *et al.*, 2003 [50]) obtenida comercialmente (véase, por ejemplo, el catálogo de Glen Research, 22825 Davis Drive, Sterling, Virginia, 20164 EE. UU.).

El experto es bien consciente de los métodos para someter a prueba la idoneidad de diferentes enlazadores. Por ejemplo, la idoneidad de un enlazador puede someterse a prueba fácilmente comparando la producción de virus y/o las tasas de transducción del vector lentiviral de la divulgación tal como se describe a continuación en el presente documento (véase también el ejemplo 4).

El enlazador usado en el presente documento es un enlazador flexible, tal como un enlazador que comprende, por ejemplo, los aminoácidos glicina, asparagina y/o serina, preferiblemente comprende los aminoácidos glicina y serina o alanina y serina. Más preferiblemente, el enlazador comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 3. Incluso más preferiblemente, el enlazador consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 3.

El cuarto segmento de secuencia según la opción (d) codifica para la glicoproteína de la envuelta del virus de la estomatitis vesicular. El virus de la estomatitis vesicular (abreviado en el presente documento como VSV) también se denomina virus Indiana de la estomatitis vesicular (VSV) y es un virus de la familia *Rhabdoviridae* de virus del grupo V (es decir, ARNmc de sentido negativo). El virus, sus hospedadores y las enfermedades provocadas por la infección con dicho virus son bien conocidas en la técnica [51-53]. La VSV-G es una glicoproteína transmembrana [6, 52] y se sabe que se asocia de manera eficiente con partículas de tipo retrovirus inmaduras, no infecciosas, de envuelta deficiente ensambladas por células de empaquetamiento para producir virus infecciosos pseudotipados en condiciones libres de células *in vitro*. Como tal, la secuencia de la glicoproteína de la envuelta del VSV también es bien conocida en la técnica e incluye, según la divulgación, una cola citoplásmica, un dominio transmembrana y una región de tallo extracelular próxima a la membrana (ectodominio o dominio extracelular) que media la gemación eficiente de virus. En la técnica se han descrito secuencias de VSV-G, por ejemplo, en [54] y el número de referencia de NCBI de la VSV-G que se produce de manera natural es NP_955548.1 (Proyecto Genoma del NCBI, 2000).

Se apreciará que el primer segmento de secuencia según la presente divulgación ya codifica para una secuencia señal de RE y, por tanto, la VSV-G codificada por el cuarto segmento de secuencia, preferiblemente, no comprende una secuencia señal de RE adicional. Para el propósito del presente documento, puede usarse o bien una secuencia de VSV-G que se produce de manera natural o bien una secuencia de VSV-G modificada [55, 56]. Por ejemplo, puede usarse la inserción de péptidos de direccionamiento, tales como RGD o la inserción de péptidos cargados de manera positiva (por ejemplo, péptidos de polilisina (K7-K20)), en el sitio de inserción de epítipo permisivo (véase [55 y 56]) de VSV-G para lograr efectos potenciados [57-60]. En caso de emplear una secuencia de VSV-G modificada, es importante que la(s) modificación/modificaciones no comprometa(n) la capacidad de la VSV-G modificada de unirse al receptor de LDL, y/o su capacidad de dar como resultado vectores lentivirales estables y correctamente procesados pseudotipados con dicha secuencia de VSV-G modificada. Preferiblemente, la modificación no está en el dominio transmembrana (por ejemplo, que oscila entre la posición 426 y 466 en la proteína de VSV-G mostrada en SEQ ID NO: 6) o en el dominio citoplásmico (por ejemplo, que oscila entre la posición 467 y la 495 en la proteína de VSV-G mostrada en SEQ ID NO: 6). También se prefiere que la modificación no esté en la región entre los aminoácidos 385 y 444 de la glicoproteína de VSV-G mostrada en SEQ ID NO: 6, puesto que esa región tiene una propensión a formar hélices α , lo que sugiere que esta región puede ser capaz de interactuar directamente con las membranas [62]. Preferiblemente, la secuencia de VSV-G no está modificada. Además, se prefiere específicamente que el dominio N-terminal de VSV-G se fusione directamente con el enlazador, tal como se definió anteriormente en el presente documento.

Según la presente divulgación, los segmentos de secuencia se disponen en el sentido de 5' a 3'. Cada segmento de secuencia puede seguir el segmento de secuencia previo sin o con secuencias intermedias. Alternativamente, o de manera adicional, pueden añadirse secuencias terminales al extremo 5' o 3', tal como se detalló anteriormente en el presente documento. Por ejemplo, se prevé explícitamente en el presente documento que un quinto segmento de secuencia (es decir, 3' del cuarto segmento) que codifica para un marcador detectable esté comprendido en la molécula de ácido nucleico de la divulgación. Un marcador detectable a modo de ejemplo, así como una secuencia intermitente a modo de ejemplo, puede ser, por ejemplo, una etiqueta para fines de purificación o detección posteriores de o bien la molécula de ácido nucleico de la divulgación o bien del polipéptido así codificado. Los ejemplos no limitativos de etiquetas incluyen etiquetas Strep, proteínas de unión a quitina (CBP), proteínas de unión a maltosa (MBP), glutatión-S-transferasa (GST), etiquetas FLAG, etiquetas HA, etiquetas Myc, etiquetas poli(His) así como derivados de las mismas o etiquetas de epítipo, tales como, por ejemplo, la etiqueta V5, etiqueta c-myc y la etiqueta HA. Todas estas etiquetas así como los derivados de las mismas son bien conocidas en la técnica y se han descrito, por ejemplo en Lichty JJ *et al.* Comparison of affinity tags for protein purification Protein Expr Purif. Mayo de 2005; 41 (1): 98-105. Preferiblemente, si se incluye una etiqueta en la proteína de fusión, la etiqueta es una etiqueta His tal como se muestra en la figura 1. Los marcadores detectables incluyen además, sin ser limitativos, marcadores radiactivos tales como ^3H , o ^{32}P o marcadores fluorescentes así como proteínas indicadoras. El marcaje de ácidos nucleicos se entiende bien en la técnica y se describe, por ejemplo, en Sambrook y Russel "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (2001). Si están presentes secuencias intermedias y/o secuencias terminales, estas van a seleccionarse de modo que no comprometan la integridad y funcionalidad de la proteína de fusión de VSV-G de la divulgación, en particular su uso como parte de un vector lentiviral que da como resultado una eficiencia de transfección aumentada de células, preferiblemente células difíciles de transfectar. El experto es consciente de las modificaciones que pueden afectar adversamente a la integridad y funcionalidad de proteínas de fusión que comprenden dominios de unión a la membrana celular basándose en su conocimiento científico y puede de ese modo identificar secuencias intermitentes y/o terminales adecuadas, si se requiere. Además, el experto puede determinar experimentalmente, por ejemplo, basándose en los experimentos descritos en el presente documento, si dicha integridad y funcionalidad están comprometidas por la adición de secuencias intermitentes y/o terminales. Preferiblemente, no están presentes secuencias intermedias entre los segmentos de secuencia segundo, tercero y cuarto, es decir, estos segmentos de secuencia se siguen entre sí directamente de modo que la secuencia de la proteína de fusión correspondiente a del segmento segundo al cuarto está constituida sólo por los nucleótidos que pertenecen a dicho segundo, tercero y cuarto segmento de secuencia. Según la presente divulgación, se establecieron proteínas de fusión de VSV-G novedosas que contienen fragmentos de anticuerpo de cadena sencilla de extremo N-terminal (scFv) dirigidos contra o bien EGFR o bien CD30 de antígeno tumoral, en los que la VSV-G y el scFv se separan mediante un enlazador flexible. Tal como se muestra en los

ejemplos adjuntos, pudieron obtenerse preparaciones de vector lentiviral (LV) de alto título usando la VSV-G modificada con scFv de la divulgación en razones específicas con VSV-G wt. También se muestra en los ejemplos adjuntos que la producción de partículas lentivirales con proteínas de fusión de VSV-G sin un enlazador condujo a una fuerte disminución en las producciones de virus y estas partículas virales no pudieron aumentar las tasas de transducción de células T47D. Por tanto, los presentes inventores concluyen que una secuencia enlazadora entre el dominio de unión a la membrana celular y la VSV-G es esencial para la funcionalidad de partículas lentivirales redirigidas a proteína de fusión de VSV-G.

Hasta el momento, no se han notificado intentos exitosos de fusionar una fusión N-terminal de un scFv con VSV-G en la técnica. En cambio, se aplicaron aproximaciones alternativas en la técnica, tales como la modificación de la superficie de vectores lentivirales con un dominio ZZ de unión a anticuerpo más pequeño derivado de proteína A de *Staphylococcus* fusionada con VSV-G [12]. Sin embargo, esta aproximación requiere que dos reactivos, el vector lentiviral modificado y los anticuerpos respectivos, estén aprobados para uso clínico, se proporcionen con pureza de calidad clínica y luego se combinen para formar el agente terapéutico activo. Por tanto, las proteínas de fusión de VSV-G novedosas de la presente divulgación proporcionan un medio mejorado para el pseudotipado de LV con el fin de preparar partículas lentivirales que tienen una eficiencia de transducción mejorada a MOI bajas y que son adecuadas para la transducción de células difíciles de transducir tales como, por ejemplo, células de linaje linfóide o células tumorales.

El (poli)péptido que comprende o que consiste en un dominio de unión a la membrana celular codificado por dicho segundo segmento de secuencia puede seleccionarse del grupo que consiste en un anticuerpo de cadena sencilla, un anticuerpo con un solo dominio, un fragmento de anticuerpo V_HH, un anticuerpo de cadena sencilla VNAR y un andamiaje proteico.

Los tipos de anticuerpos mencionados anteriormente incluyen, tal como se describió anteriormente en el presente documento, anticuerpos quiméricos (dominio constante humano, dominio constante no humano) y humanizados (anticuerpo humano con la excepción de CDR no humanas).

El término “andamiaje proteico”, también usado en el presente documento indistintamente con el término “andamiaje proteico modificado por ingeniería genética” es bien conocido en la técnica y se refiere a una nueva generación de proteínas receptoras que se derivan de “andamiajes” no-inmunoglobulina pequeños y robustos que pueden equiparse con funciones de unión prescritas usando métodos de diseño combinatorio de proteínas (Gebauer y Skerra (2009) Engineered protein scaffolds as next-generation antibody therapeutics. *Curr Opin Chem Biol*, 13, 245-255.). Los ejemplos preferidos, pero no limitativos, de andamiajes proteicos modificados por ingeniería genética incluyen adnectinas, Affibodies, anticalinas y DARPin.

“Adnectinas” (también denominadas monocuerpos) según la presente divulgación, se basan en el 10^o dominio extracelular de fibronectina humana III (10Fn3), que adopta un pliegue de tipo Ig en forma de sándwich b de 94 residuos con de 2 a 3 bucles expuestos, pero carece del puente disulfuro central.

“Affibodies”, según la presente divulgación, se basan en el dominio Z de proteína A de *Staphylococcus*, un haz de tres hélices de aproximadamente 58 residuos que proporciona una superficie de contacto en dos de sus hélices-a.

El término “anticalinas” tal como se usa en el presente documento se refiere a proteínas modificadas por ingeniería genética derivadas de lipocalinas (Beste, G., Schmidt, F.S., Stibora, T., Skerra, A. (1999) Small antibody-like proteins with prescribed linker specificities derived from the lipocalin fold. *PNAS*, 96, 1898-903). Las anticalinas poseen un cilindro β de ocho hebras que forma una unidad de núcleo altamente conservada entre las lipocalinas y forma de manera natural sitios de unión para ligandos por medio de cuatro bucles variables estructuralmente en el extremo abierto. Las anticalinas, aunque no son homólogas a la superfamilia de IgG, muestran características que hasta ahora se han considerado típicas de los sitios de unión de anticuerpos: (i) alta plasticidad estructural como consecuencia de la variación de secuencias y (ii) elevada flexibilidad conformacional, lo que permite un ajuste inducido a dianas con forma diferente.

Según la presente divulgación, el término “DARPin” se refiere a dominios de repetición de anquirina diseñados (166 residuos), que proporcionan una superficie de contacto rígida que surge normalmente de tres giros b repetidos. Los DARPin normalmente portan tres repeticiones que corresponden a una secuencia de consenso artificial, mediante lo cual se aleatorizan seis posiciones por repetición. Por consiguiente, los DARPin carecen de flexibilidad estructural.

Un “péptido del dominio de Kunitz” se deriva del dominio de Kunitz de un inhibidor de la proteasa de tipo Kunitz tal como, por ejemplo, el inhibidor de la tripsina pancreática bovina (BPTI), la proteína precursora amiloide (APP) o el inhibidor de la ruta del factor tisular (TFPI). Los dominios de Kunitz tienen un peso molecular de aproximadamente 6 kDA y pueden seleccionarse dominios con la especificidad objetivo requerida mediante técnicas de visualización tales como visualización de fagos (Gebauer y Skerra (2009) Engineered protein scaffolds das next-generation antibody therapeutics. *Curr Opin Chem Biol*, 13, 245-255.).

El (poli)péptido que comprende o que consiste en un dominio de unión a la membrana celular codificado por dicho

- segundo segmento de secuencia puede ser un anticuerpo de cadena sencilla. En cuanto a la disposición del dominio de V_L y V_H en el dominio de inmunoglobulinas, el dominio de V_L puede estar ubicado en el extremo N- o C-terminal del dominio de V_H . Por consiguiente, en el ácido nucleico de la presente divulgación, el ácido nucleico que codifica para el dominio de V_L puede estar ubicado en el extremo 5' o 3' de aquel que codifica para el dominio de V_H . El experto puede determinar qué disposición de los dominios de V_H y V_L es más adecuada para un scFv específico. El (poli)péptido que comprende o que consiste en un dominio de unión a la membrana celular puede unirse específicamente a uno o más constituyentes de la membrana celular seleccionados del grupo que consiste en glicolípidos, fosfolípidos, oligosacáridos y proteínas.
- Los glicolípidos son lípidos con un hidrato de carbono unido, que están presentes en membranas celulares donde sirven, entre otros, para el reconocimiento celular. Los ejemplos no limitativos de glicolípidos incluyen glicero glicolípidos, glicosfingolípidos y glicosilfosfatidilinositoles.
- Los fosfolípidos son lípidos anfífilos que contienen un grupo fosfato. Los fosfolípidos más comúnmente encontrados en la membrana celular son fosfatidilcolina (lecitina, abreviada PC), fosfatidiletanolamina (cefalina, abr. PE), fosfatidilserina (PS) y esfingomielinas. Basándose en su constitución química, se agrupan en dos grupos, los glicero fosfolípidos que tienen glicerina como su estructura básica y las esfingomielinas, que son esfingolípidos que contienen fosfato derivados de esfingosina.
- Los oligosacáridos son polímeros de sacárido que contienen un pequeño número de azúcares simples (monosacáridos). Se encuentran comúnmente en la membrana plasmática de células animales donde, entre otros, desempeñan un papel en el reconocimiento entre células.
- Tal como se definió anteriormente en el presente documento, las proteínas son cadenas moleculares lineales de aminoácidos que contienen 30 aminoácidos o más. Las proteínas preferidas según este aspecto son receptores celulares acoplados a proteínas G (GPCR), proteínas de superficie celular de agrupación de diferenciación (CD; también denominada "agrupación de designación" en la técnica), receptores de superficie celular o correceptores de superficie celular.
- En la molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento, (a) el primer segmento de secuencia que codifica para dicha secuencia señal de RE puede comprender o consistir en la secuencia de ácido nucleico tal como se muestra en SEQ ID NO: 1 o una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos una identidad de secuencia del 60% con SEQ ID NO: 1; (b) el tercer segmento de secuencia que codifica para un enlazador puede comprender o consistir en la secuencia de ácido nucleico tal como se muestra en SEQ ID NO: 3 o una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos una identidad de secuencia del 60% con SEQ ID NO: 3; y/o (c) el cuarto segmento de secuencia que codifica para dicha VSV-G puede comprender o consistir en la secuencia de ácido nucleico tal como se muestra en SEQ ID NO: 5 o una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos una identidad de secuencia del 60% con SEQ ID NO: 5.
- Por consiguiente, la presente divulgación también abarca moléculas de ácido nucleico, secuencias de ácido nucleico o segmentos de secuencia que tienen al menos una identidad del 60% (tal como al menos el 70%, preferiblemente al menos el 80%, más preferiblemente al menos el 90%, incluso más preferiblemente al menos el 95% tal como al menos el 98% y lo más preferiblemente al menos una identidad del 99%) con la molécula de ácido nucleico representada por los números de SEQ ID mencionados. Tales moléculas variantes pueden ser formas de corte y empalme o moléculas homólogas de otras especies. Se apreciará que esta molécula de ácido nucleico variante, no obstante, tiene que codificar para una secuencia de aminoácidos que tiene las funciones indicadas, es decir, la secuencia codificada por una variante de SEQ ID NO: 1 ha de ser una secuencia señal de RE; la secuencia codificada por una variante de SEQ ID NO: 3 ha de ser un enlazador; y la secuencia codificada por una variante de SEQ ID NO: 5 ha de codificar para una glicoproteína que tiene función de VSV-G tal como se definió anteriormente en el presente documento.
- Según la presente divulgación, el término "al menos % idéntico a" en relación con moléculas de ácido nucleico describe el número de concordancias ("aciertos") de ácidos nucleicos idénticos de dos o más secuencias de ácido nucleico alineadas en comparación con el número de residuos de ácido nucleico que constituyen la longitud global de las secuencias de aminoácidos (o la parte comparada global de la misma). En otros términos, usando una alineación para dos o más secuencias o subsecuencias, puede determinarse el porcentaje de residuos de ácido nucleico que son iguales (por ejemplo al menos una identidad del 60%), cuando las (sub)secuencias se comparan y alinean para máxima correspondencia sobre una ventana de comparación, o sobre una región designada tal como se mide usando un algoritmo de comparación de secuencias tal como se conoce en la técnica, o cuando se alinean de manera manual e inspeccionan visualmente. Los ácidos nucleicos preferidos según la divulgación son aquellos en los que la identidad descrita existe sobre una región que es al menos de 100 a 150 nucleótidos de longitud, más preferiblemente, sobre una región que es al menos de 200 a 400 nucleótidos de longitud. Los ácidos nucleicos más preferidos según la presente divulgación son aquellos que tienen la identidad de secuencia descrita sobre toda la longitud de la molécula de ácido nucleico tal como se describe en (a) y (b) citados anteriormente. Las dos secuencias, cuando se alinean, pueden presentar la al menos identidad del 60% sobre la misma longitud, es decir, sin extenderse ninguna secuencia en el extremo 3' o 5' sobre la otra secuencia. En la alternativa, si se produce tal

extensión, se prefiere que no supere más de 30 nucleótidos, más preferido no más de 15 nucleótidos sobre cualquier extremo terminal de la otra secuencia.

Se conoce bien en la técnica cómo determinar el porcentaje de identidad de secuencia entre secuencias usando, por ejemplo, algoritmos tales como los basados en el programa informático CLUSTALW (Thompson Nucl. Acids Res. 2 (1994), 4673-4680) o FASTA (Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci., 1988, 85; 2444). Aunque el algoritmo FASTA normalmente no considera deleciones o adiciones internas que no coinciden en secuencias, es decir, huecos, en su cálculo, esto puede corregirse manualmente para evitar una sobreestimación del % de identidad de secuencia. CLUSTALW, sin embargo, tiene en cuenta los huecos de secuencia en sus cálculos de identidad. También están disponibles para los expertos en la técnica los algoritmos BLAST y BLAST 2.0 (Altschul, Nucl. Acids Res., 1977, 25:3389). El programa BLASTN para secuencias de ácido nucleico usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, M = 5, N = 4 y una comparación de ambas cadenas. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa por defecto una longitud de palabra (W) de 3 y una expectativa (E) de 10. La matriz de puntuación BLOSUM62 (Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci., 1989, 89:10915) utiliza alineaciones (B) de 50, expectativa (E) de 10, M = 5, N = 4 y una comparación de ambas cadenas. Todos esos programas pueden usarse para el propósito del presente documento. Sin embargo, preferiblemente se usa el programa BLAST. Por consiguiente, todas las moléculas de ácido nucleico que tienen la función prescrita y que además tienen una identidad de secuencia de al menos el 60% tal como se determina con cualquiera de los programas mencionados o adicionales anteriores disponibles para el experto y preferiblemente con el programa BLAST se encuentran dentro del alcance de la divulgación.

En la molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento, (a) el primer segmento de secuencia que codifica para dicha secuencia señal de RE comprende o consiste en la secuencia de ácido nucleico tal como se muestra en SEQ ID NO: 1; (b) el tercer segmento de secuencia que codifica para un enlazador comprende o consiste en la secuencia de ácido nucleico tal como se muestra en SEQ ID NO: 3; y/o (c) el cuarto segmento de secuencia que codifica para dicha VSV-G comprende o consiste en la secuencia de ácido nucleico tal como se muestra en SEQ ID NO: 5.

La molécula de ácido nucleico puede tener la secuencia de ácido nucleico global de SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 9.

También se describe en el presente documento un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de la divulgación.

Preferiblemente, el vector es un plásmido, cósmido, virus, bacteriófago u otro vector usado, por ejemplo, de manera convencional en ingeniería genética. La molécula de ácido nucleico de la presente divulgación puede insertarse en varios vectores disponibles comercialmente adecuados para la expresión de proteínas eucariotas. Los ejemplos no limitativos incluyen vectores plasmídicos procariotas, tales como la serie pUC, pBluescript (Stratagene), la serie pET de vectores de expresión (Novagen) o pCROTOPO (Invitrogen) y vectores compatibles con una expresión en células de mamífero como pREP (Invitrogen), pcDNA3 (Invitrogen), pCEP4 (Invitrogen), pMC1neo (Stratagene), pXT1 (Stratagene), pSG5 (Stratagene), EBO-pSV2neo, pBPV-1, pdBPVMMTneo, pRSVgpt, pRSVneo, pSV2-dhfr, pIZD35, pLXIN, pSIR (Clontech), pIRES-EGFP (Clontech), pEAK-10 (Edge Biosystems) pTriEx-Hygro (Novagen) y pCINeo (Promega).

La molécula de ácido nucleico de la presente divulgación mencionada anteriormente también puede insertarse en vectores de modo que se genere una fusión traduccional con otro polinucleótido. El otro polinucleótido puede codificar para una proteína que puede, por ejemplo, aumentar la solubilidad y/o facilitar la purificación de la proteína de fusión. Los ejemplos no limitativos incluyen pET32, pET41, pET43. Para técnicas de modificación de vectores, véase Sambrook y Russell "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (2001). En general, los vectores pueden contener uno o más sistemas de origen de replicación (ori) y de herencia para clonación o expresión, uno o más marcadores para la selección en el hospedador, por ejemplo, resistencia a antibióticos, y uno o más casetes de expresión. Los orígenes de replicación adecuados (ori) incluyen, por ejemplo, los orígenes de replicación Col E1, SV40 viral y M 13. Las secuencias codificantes insertadas en el vector pueden, por ejemplo, sintetizarse mediante métodos convencionales, o aislarse de fuentes naturales. La ligación de las secuencias codificantes a elementos reguladores de la transcripción y/o a otras secuencias que codifican para aminoácidos puede llevarse a cabo utilizando métodos establecidos. Los elementos reguladores de la transcripción (partes de un casete de expresión) que aseguran la expresión de las secuencias codificantes son bien conocidos para los expertos en la técnica. Estos elementos comprenden secuencias reguladoras que aseguran el inicio de la transcripción (por ejemplo, codón de inicio de la traducción, promotores, potenciadores y/o aislantes), sitios internos de entrada al ribosoma (IRES) (Owens, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98 (2001), 1471-1476) y, opcionalmente, señales de poli-A que garantizan la terminación de la transcripción y la estabilización del transcrito. Los elementos reguladores adicionales pueden incluir potenciadores transcripcionales así como traduccionales, y/o regiones promotoras heterólogas o asociadas naturalmente. Preferiblemente, la molécula de ácido nucleico de la divulgación está ligada operativamente a tales secuencias de control de la expresión que permiten su expresión. El vector puede comprender además secuencias de nucleótidos que codifican para señales de secreción como elementos reguladores adicionales. Tales secuencias son bien conocidas por el experto en la técnica. Además, dependiendo del sistema de expresión utilizado, pueden añadirse secuencias líderes que pueden dirigir el polipéptido expresado a

un compartimento celular a la secuencia codificante del polinucleótido de la divulgación. Tales secuencias líderes son bien conocidas en la técnica. Los posibles ejemplos de elementos reguladores que aseguran el inicio de la transcripción comprenden el promotor de citomegalovirus (CMV), el promotor de SV40, el promotor de RSV (virus del sarcoma de Rous), el promotor lacZ, el promotor gai10, el promotor del factor de elongación humano 1 α , el potenciador de CMV, el promotor de la quinasa CaM, el promotor poliédrico del virus de la poliedrosis nuclear múltiple de *Autographa californica* (AcMNPV) o el potenciador de SV40. Para la expresión en procariontes, se ha descrito una multitud de promotores que incluyen, por ejemplo, el promotor tac-lac, el promotor lacUV5 o trp. Los ejemplos de elementos reguladores adicionales en células procariontes y eucariotas comprenden señales de terminación de la transcripción, tales como el sitio SV40-poli-A o el sitio tk-poli-A o las señales de poliadenilación poliédrica de SV40, lacZ y AcMNPV, en el sentido de 3' del polinucleótido. Además, se prefiere que el vector de la divulgación comprenda un marcador seleccionable. Los ejemplos de marcadores seleccionables incluyen resistencia a neomicina, ampicilina e higromicina y similares. Los vectores diseñados específicamente permiten la transferencia de ADN entre hospedadores diferentes, tales como células bacterianas-fúngicas o células bacterianas-animales. Un vector de expresión según esta divulgación puede dirigir la replicación, y la expresión, de la molécula de ácido nucleico y la proteína de fusión codificada de esta divulgación. Los vectores de expresión adecuados que comprenden los elementos reguladores descritos son bien conocidos en la técnica, tales como pGreenPuro (System Biosciences, Mountain View, CA, EE. UU.), PRC/CMV, pcDNA1, pcDNA3 (In-VitroGene, tal como se usa, entre otros en los ejemplos adjuntos), pSPORT1 (GIBCO BRL) o pGEMHE (Promega), o vectores de expresión procariontes, tales como lambda gt11, pJOE, la serie pBR1-MCS.

Las moléculas de ácido nucleico dadas a conocer anteriormente en el presente documento pueden diseñarse para la introducción directa o para la introducción por medio de liposomas, vectores de fagos o vectores virales (por ejemplo adenovirales, retrovirales) en la célula. Además, pueden usarse sistemas de baculovirus o sistemas basados en el virus de la vaccinia o virus del bosque Semliki como sistema de expresión eucariota para las moléculas de ácido nucleico de la divulgación.

También se describe en el presente documento una célula hospedadora que comprende la molécula de ácido nucleico o el vector de la divulgación.

Los hospedadores procariontes adecuados comprenden, por ejemplo, bacterias de las especies *Escherichia*, *Streptomyces*, *Salmonella* o *Bacillus*. Las células hospedadoras eucariotas adecuadas son, por ejemplo, levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe* o células de gallina, tales como, por ejemplo, células DT40. Las células de insecto adecuadas para la expresión son, por ejemplo, *Drosophila* S2, *Drosophila* Kc o células Sf9 y Sf21 de *Spodoptera*. Las líneas celulares de pez cebra adecuadas incluyen, sin ser limitativas, ZFL, SJD o ZF4.

Las células hospedadoras de mamífero que pueden usarse incluyen células humanas Hela, HEK293, HEK293T, H9 y Jurkat, células de ratón NIH3T3 y C127, COS 1, COS 7 y CV1, células de codorniz QC1-3, células de ratón L, células de sarcoma de ratón, células de melanoma de Bowes, células humanas CAP o T CAP y células de ovario de hámster chino (CHO). También se describen en el presente documento células de mamífero primarias o líneas celulares. Las células primarias son células que se obtienen directamente de un organismo. Las células primarias adecuadas son, por ejemplo, fibroblastos embrionarios de ratón (MEF), hepatocitos primarios de ratón, cardiomiocitos y células neuronales así como células madre musculares de ratón (células satélite), fibroblastos humanos dérmicos y pulmonares, células epiteliales humanas (células epiteliales nasales, traqueales, renales, placentarias, intestinales, bronquiales), células secretoras humanas (de glándulas salivares, sebáceas y sudoríparas), células endocrinas humanas (células tiroideas), células adiposas humanas, células de músculo liso humanas, células de músculo esquelético humanas y líneas celulares estables e inmortalizadas derivadas de las mismas (por ejemplo, hTERT o células inmortalizadas de oncogén). En la técnica se conocen medios y condiciones de cultivo apropiados para las células hospedadoras descritas anteriormente.

La célula hospedadora puede, por ejemplo, emplearse en métodos para la amplificación de vectores de la divulgación, para la producción de la proteína de fusión de la divulgación o para la producción directa de partículas lentivirales, tal como se describe en más detalle a continuación en el presente documento.

También se describe en el presente documento un polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico de la divulgación.

Por ejemplo, el polipéptido de la presente divulgación puede tener una secuencia de aminoácidos global seleccionada de las secuencias representadas en SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 10.

También se describe en el presente documento un método de producción de la proteína de fusión de VSV-G de la divulgación, comprendiendo el método cultivar la célula hospedadora de la divulgación en condiciones adecuadas y aislar la proteína de fusión de VSV-G producida.

El experto en la técnica conoce bien las condiciones adecuadas para el cultivo de un hospedador procarionte o eucariota. Por ejemplo, condiciones adecuadas para cultivar bacterias haciéndolas crecer con aireación en medio

Luria Bertani (LB). Para aumentar el rendimiento y la solubilidad del producto de expresión, el medio puede tamponarse o complementarse con aditivos adecuados conocidos por potenciar o facilitar ambos. Puede cultivarse *E. coli* desde 4 hasta aproximadamente 37°C, la temperatura exacta o secuencia de temperaturas depende de la molécula que va a sobreexpresarse. En general, el experto también es consciente de que puede que estas condiciones deban adaptarse a las necesidades del hospedadora y los requisitos de la proteína expresada. En caso de que un promotor inducible controle el ácido nucleico de la divulgación en el vector presente en la célula hospedadora, la expresión del polipéptido puede inducirse mediante la adición de un agente de inducción apropiado. El experto conoce protocolos y estrategias de expresión adecuados.

Dependiendo del tipo de célula y sus requisitos específicos, el cultivo de células de mamífero puede llevarse a cabo, por ejemplo, en medio RPMI, Williams' E o DMEM que contiene FCS al 10% (v/v), L-glutamina 2 mM y penicilina/estreptomicina 100 U/ml. Las células pueden mantenerse, por ejemplo, a 37°C o a 41°C para células de gallina DT40, en una atmósfera saturada en agua con el 5% de CO₂. El medio adecuado para el cultivo de células de insecto es, por ejemplo, medio TNM + FCS al 10% o SF900. Las células de insecto se hacen crecer habitualmente a 27°C como cultivo de adhesión o suspensión. Los protocolos de expresión adecuados para células de vertebrados o eucariotas son bien conocidos por el experto, y pueden recuperarse, por ejemplo, de Sambrook y Russel, *loc.cit.*

El término "aislar" se refiere a una acumulación selectiva de la proteína de fusión de VSV-G producida, retirando la proteína de fusión de VSV-G producida de las células hospedadoras o del medio en el que se han cultivado las células hospedadoras. Preferiblemente, la proteína de fusión de VSV-G aislada es el 100% pura, es decir, está libre de cualquier otro componente que no sea la proteína de fusión de VSV-G de la divulgación. Los métodos de aislamiento de la proteína de fusión producida son bien conocidos en la técnica y comprenden, sin limitación, etapas del método tales como cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel (cromatografía de exclusión molecular), cromatografía de afinidad, cromatografía líquida de alta presión (HPLC), HPLC de fase inversa, electroforesis en gel discontinua o inmunoprecipitación, véase, por ejemplo, en Sambrook y Russel, *loc.cit.*

El experto apreciará que el término "aislamiento de la proteína de fusión producida" se refiere al aislamiento de la proteína codificada por la molécula de ácido nucleico de la presente divulgación.

La presente divulgación se basa en partículas de vector lentiviral pseudotipadas.

Una "partícula de vector lentiviral", también denominada en el presente documento "vector lentiviral", es un vector basado en un virión lentiviral, es decir, una subclase de retrovirus que pueden integrarse en el genoma de células diana no en división. Una característica única de los lentivirus es que tienen una región de replicación autoinactivada (SIN) a diferencia de otros vectores retrovirales. Los lentivirus son bien conocidos en la técnica y se han descrito en detalle, por ejemplo, en *Retroviruses*, Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE, Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbour Laboratory Press; 1997; ISBN-10:0-87969-571-4; O'Connell RM, Balazs AB, Rao DS, Kivork C, Yang L, Baltimore D. Lentiviral vector delivery of human interleukin-7 (hIL-7) to human immune system (HIS) mice expands T lymphocyte populations. *PLoS One*. 6 de agosto de 2010;5(8):e12009; Mátrai J, Chuah MK, Vanden-Driessche T. Recent advances in lentiviral vector development and applications. *Mol Ther*. Marzo de 2010;18(3):477-90.

Una partícula de vector lentiviral puede basarse en, por ejemplo, un lentivirus del grupo de lentivirus bovinos, equinos, felinos, ovinos/caprinos o de primate. Preferiblemente, el vector lentiviral se basa en un lentivirus de primate tal como el virus VIH1, VIH2 o VIS. Lo más preferido, el vector lentiviral se basa en un lentivirus VIH1. Como sabe el experto, la mayoría de los vectores lentivirales (disponibles comercialmente) representan una mezcla de constituyentes virales de diferentes virus y, por tanto, son en cierta medida vectores "híbridos". Por ejemplo, un vector lentiviral puede comprender constituyentes de los virus VIH1, VSVg, CMV, WPRE. Tales vectores híbridos se contemplan explícitamente.

El término "pseudotipado", tal como se usa en el presente documento en el contexto de vectores virales, se refiere a la modulación de la especificidad del tipo celular de un vector viral mediante la integración de proteínas de envuelta viral extrañas. Esta aproximación es bien conocida en la técnica y se ha descrito, por ejemplo, en Bischof *et al.* (Flexibility in cell targeting by pseudotyping lentiviral vectors. *Methods Mol Biol*. 2010; 614: 53-68). Usando esta aproximación, el tropismo del hospedador puede alterarse y/o la estabilidad del virus puede disminuirse o aumentarse. Por ejemplo, se ha descrito el uso de VSV-G para someter a pseudotipado un virus lentiviral, por ejemplo, en Burns *et al.* (Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90 (17): 8033-8037).

Aunque las reivindicaciones se refieren a VSV-G nativa, la divulgación no está limitada a ello e incluye el uso de "una VSV-G no ligada a un (poli) péptido que comprende o que consiste en un dominio de unión a la membrana celular". En este contexto, el uso de moléculas de VSV-G que no se producen de manera natural (es decir, modificadas) no se excluye, siempre que no estén ligadas a un (poli) péptido que comprende o que consiste en un dominio de unión a la membrana celular.

Tal como se usa en el presente documento, los términos “una proteína de fusión de VSV-G” y “una VSV-G no ligada a ...” no se limitan a “una” de las moléculas mencionadas. En cambio, estos términos definen los tipos de moléculas que están presentes, sin cualquier limitación particular en número. En otras palabras, el término “una proteína de fusión de VSV-G” abarca explícitamente una o más proteínas de fusión de VSV-G y el término “una VSV-G no ligada a ...” abarca explícitamente una o más VSV-G no ligadas a un (poli)péptido que comprende o que consiste en un dominio de unión a la membrana celular.

La invención se refiere a una partícula de vector lentiviral tal como se define en las reivindicaciones. Esencialmente, la partícula de la invención es una partícula de vector lentiviral que se somete a pseudotipado con dos tipos diferentes de proteínas de VSV-G, concretamente con la proteína de fusión de la invención descrita anteriormente en el presente documento (opción (a)) y con una VSV-G que no se ha fusionado con un dominio de unión a la membrana celular, es decir, una VSV-G nativa (wt) (opción (b)). En otras palabras, cada partícula de vector lentiviral individual expresa glicoproteínas VSV-G tanto modificadas como nativa sobre su superficie.

Sorprendentemente, se descubrió que el pseudotipado con ambas VSV-G es ventajoso sobre el uso de una de estas proteínas solo. En primer lugar, el uso del 100% de la proteína de fusión de VSV-G de la invención no pudo infectar células en ensayos citométricos, tal como se muestra, por ejemplo, en el ejemplo 4, no logrando así la transducción prevista. En segundo lugar, tal como también se muestra en los ejemplos adjuntos, una mezcla de la molécula de la invención con moléculas wt condujo a tasas de infección potenciadas en comparación con el tipo natural solo.

De manera crucial, la razón (a):(b) presentada por dicha partícula de vector lentiviral pseudotipada en la envuelta viral está entre aproximadamente el 10%: aproximadamente el 90% y aproximadamente el 50%: aproximadamente el 50%.

En otras palabras, la razón de proteína de fusión de VSV-G con respecto a VSV-G wt está en el intervalo entre de aproximadamente el 10% de proteína de fusión de VSV-G a aproximadamente el 90% de VSV-G wt y de aproximadamente el 50% de proteína de fusión de VSV-G a aproximadamente el 50% de VSV-G wt. Preferiblemente, la razón es de aproximadamente el 33% de la proteína de fusión de VSV-G y aproximadamente el 67% de VSV-G wt.

El término “aproximadamente”, tal como se usa en el presente documento, abarca los valores mencionados explícitamente así como pequeñas desviaciones de los mismos. En otras palabras, un porcentaje de “aproximadamente el 33%” incluye, pero no tiene que ser exactamente la cantidad mencionada del 33% pero puede diferir en varios %, incluyendo, por tanto, por ejemplo, el 31%, el 32%, el 34% o el 35%. El experto es consciente de que tales valores son valores relativos que no requieren una precisión completa siempre que los valores se correspondan aproximadamente con los valores mencionados. Por consiguiente, una desviación del valor mencionado de, por ejemplo, el 15%, más preferiblemente del 10%, está abarcada por el término “aproximadamente”. Según la invención, “aproximadamente” es una desviación de hasta el 5% de los porcentajes dados.

La presente invención se refiere además a un método de producción de la partícula de vector lentiviral pseudotipada de la invención, comprendiendo el método transfectar en una célula hospedadora (i) uno o más plásmidos de empaquetamiento que codifican para las proteínas de virión; (ii) un vector que comprende la molécula de ácido nucleico tal como se define por las reivindicaciones; y (iii) un vector que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica para una VSV-G nativa.

Tales métodos de producción de vectores lentivirales pseudotipados son bien conocidos en la técnica y se han descrito, por ejemplo en Naldini, L. (1998) [61]. Se emplean células hospedadoras, preferiblemente células HEK 293, HEK293T, CAP o T CAP y varios vectores, incluyendo el/los vector(es) de empaquetamiento que codifica(n) para las proteínas virales, tales como, por ejemplo, la cápside y la transcriptasa inversa, así como vectores que portan las moléculas de ácido nucleico que van a introducirse adicionalmente en la partícula de vector lentiviral pseudotipada se transfectan o electroporan en estas células, o se usa nucleofección para transferir dichos vectores. Además, pueden transfectarse vectores adicionales que contienen el material genético que la partícula de vector lentiviral pseudotipada va a administrar.

Estos vectores pueden introducirse en las células hospedadoras mediante introducción directa o mediante introducción por medio de electroporación (usando, por ejemplo, Multiporator (Eppendorf), Genepulser (BioRad), MaxCyte Transfection Systems (Maxcyte)), PEI (Polysciences Inc. Warrington, Eppelheim), transfección mediada por Ca²⁺ o por medio de liposomas (por ejemplo: “Lipofectamine” (Invitrogen)), compuestos no liposomales (por ejemplo: “Fugene” (Roche) o nucleofección (Lonza)) en células.

Todas las definiciones y realizaciones preferidas proporcionadas anteriormente en el presente documento con respecto a la partícula de vector lentiviral pseudotipada de la invención se aplican, haciendo los cambios necesarios, al método para producir las otras partículas de vector lentiviral pseudotipadas dadas a conocer pero no reivindicadas como parte de la invención. Por ejemplo, las razones preferidas entre la proteína de fusión de VSV-G de la divulgación y una VSV-G que no se fusiona con un dominio de unión a la membrana celular se aplican igualmente a

las razones empleadas en el procedimiento de producción de las partículas de vector lentiviral pseudotipadas de la invención. Por tanto, con el fin de obtener, por ejemplo, la razón preferida de aproximadamente el 67% de las VSV-G no ligadas a un (poli) péptido que comprenden o que consisten en un dominio de unión a la membrana celular con respecto a aproximadamente el 33% de la proteína de fusión de VSV-G de la divulgación, el doble del vector de la opción (iii) se añade a las células hospedadoras en comparación con el vector de la opción (ii), dando como resultado, por tanto, una razón aproximada de 2:1, es decir, el 67% con respecto al 33%.

También se da a conocer un método para transducir células, comprendiendo el método la etapa de: poner en contacto células que van a transducirse con la partícula de vector lentiviral pseudotipada de la invención en condiciones adecuadas para la transducción, transduciendo de ese modo dichas células. Por consiguiente, también se describe en el presente documento el uso de partículas de vector lentiviral de la invención para la transducción de células diana aunque la invención reivindicada se limita a tales métodos y usos llevados a cabo *ex vivo* o *in vitro*.

El término "transducir", tal como se usa en el presente documento, es bien conocida en la técnica y se refiere al procedimiento de introducir material genético en una célula y, opcionalmente, su posterior integración en el genoma de dicha célula por medio de partículas de vectores virales. Dicho material genético comprende o consiste en ARN viral combinado con una o más secuencias de ARN diana (a continuación, en el presente documento, denominadas secuencias diana) comprendidas en dichas partículas de vectores virales destinadas a la integración en el genoma de una célula diana.

El término "poner en contacto" tal como se usa en este contexto se refiere a la puesta en contacto de las células que van a transducirse (también denominadas en el presente documento "células diana") con un vector retroviral de modo que pueda producirse el acontecimiento de transducción. Las condiciones para la puesta en contacto que permiten que se produzca el acontecimiento de transducción son bien conocidas en la técnica y pueden depender en cierta medida de la célula que va a transducirse. Por ejemplo, algunas células diana son más difíciles de transfectar que otras células y pueden necesitar la transición a un medio de cultivo específico antes de que pueda lograrse la transducción con un vector viral. Se describen métodos y condiciones correspondientes, por ejemplo, en Jacome *et al.* (Lentiviral-mediated Genetic Correction of Hematopoietic and Mesenchymal Progenitor Cells From Fanconi Anemia Patients. *Mol Ther.* Junio de 2009; 17(6): 1083-1092), Chu *et al.* (Efficient and Stable Gene Expression into Human Osteoclasts Using an HIV-1-Based Lentiviral Vector. *ADN Cell Biol.* Junio de 2008; 27(6): 315-320), o Poczobutt *et al.* (Benign mammary epithelial cells enhance the transformed phenotype of human breast cancer cells. *BMC Cancer.* 2010; 10: 373). Se describen condiciones a modo de ejemplo en la sección de ejemplos.

Las células que van a transducirse pueden ser cualquier célula de interés que va a dirigirse a la transducción con un vector viral. El término "célula/células", tal como se usa en el presente documento, puede referirse a células individuales y/o aisladas o a células que forman parte de una entidad multicelular tal como un tejido, un organismo o un cultivo celular. En otras palabras, el método puede realizarse *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*, aunque las reivindicaciones excluyen métodos *in vivo*. Preferiblemente, las células que van a transducirse son células eucariotas que incluyen cualquier célula de un organismo eucariota multicelular, preferiblemente células de animales como vertebrados. Más preferiblemente, las células que van a transducirse son células de mamífero. Dependiendo del objetivo particular que va a lograrse modificando el genoma de una célula de mamífero transduciéndolo según el método de la invención, pueden usarse células de diferentes subclases de mamífero tales como Prototheria o Theria. Por ejemplo, dentro de la subclase Theria, se usan preferiblemente células de animales de la infraclase Eutheria, más preferiblemente del orden Primates, Artiodactyla, Perissodactyla, Rodentia y Lagomorpha en el método de la invención. Además, dentro de una especie, puede elegirse una célula que va a usarse en el método de la invención en función del tipo de tejido y/o la capacidad de diferenciarse por igual dependiendo del objetivo que va a alcanzarse modificando el genoma mediante la transducción de una célula diana según el método de la invención. Tres categorías básicas de células, que en principio pueden transducirse con el método de la invención, conforman el cuerpo de los mamíferos: células germinales, células somáticas y células madre. Una célula germinal es una célula que da origen a los gametos y, por tanto, es continua a través de las generaciones. Las células madre pueden dividirse y diferenciarse dando diversos tipos de células especializadas, así como también renovarse para producir más células madre. En los mamíferos hay dos tipos principales de células madre: células madre embrionarias y células madre adultas. Las células somáticas incluyen todas las células que no son gametos, gametocitos o células madre no diferenciadas. Las células de un mamífero también pueden agruparse por su capacidad para diferenciarse. Una célula totipotente (también conocida como omnipotente) es una célula que puede diferenciarse dando todos los tipos de células de un organismo adulto, incluyendo tejido placentario tal como un cigoto (ovocito fertilizado) y blastómeros posteriores, mientras que las células pluripotentes, tales como células madre embrionarias, no pueden contribuir al tejido extraembrionario tal como la placenta, pero tienen el potencial de diferenciarse dando cualquiera de las tres capas germinales endodermo, mesodermo y ectodermo. Las células progenitoras multipotentes tienen el potencial para dar lugar a células de múltiples, pero limitado número, de linajes celulares. Además, hay células oligopotentes que pueden desarrollarse en unos pocos tipos de células y células unipotentes (también denominadas a veces células precursoras) que pueden desarrollarse en un solo tipo de célula. Existen cuatro tipos básicos de tejidos: tejido muscular, tejido nervioso, tejido conjuntivo y tejido epitelial de los que pueden derivarse las células que van a usarse en el método de la invención, tales como, por ejemplo, células de linaje linfóide o células madre neuronales. En la medida en que se prevé el uso de células humanas en los métodos descritos en el presente documento, así como en los métodos de la invención, dicha célula humana no se obtiene

directamente de un embrión humano. Por otro lado, las células madre embrionarias humanas están a disposición del experto, tales como las tomadas de líneas existentes de células madre embrionarias disponibles comercialmente u obtenidas por métodos que no requieren la destrucción de un embrión humano. Alternativamente, o en lugar de células madre embrionarias humanas, pueden usarse células pluripotentes que se parecen a las células madre embrionarias como células madre pluripotentes inducidas (iPS), cuya generación es de última tecnología (Hargus G *et al.*, 2010, Proc Natl Acad Sci U S A, 107: 15921-15926; Jaenisch R. y Young R., 2008, Cell 132: 567-582; Saha K y Jaenisch R., 2009, Cell Stem Cell 5: 584-595).

Tal como se comentó anteriormente en el presente documento y tal como se muestra en los ejemplos adjuntos, se encontró que pueden transducirse incluso células difíciles de transducir, tales como líneas celulares de linfoma o líneas celulares tumorales mediante un método que emplea las partículas de vector lentiviral de la presente invención.

En una realización preferida del método para transducir células de la presente invención, el método comprende además poner en contacto las células con un adyuvante, preferiblemente un poloxámero que tiene un peso molecular de 12,8 kDa a aproximadamente 15 kDa.

El término “adyuvante”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto que potencia la eficiencia de la transducción lentiviral. Los ejemplos no limitativos de adyuvantes incluyen, por ejemplo, un poloxámero que tiene un peso molecular de 12,8 kDa a aproximadamente 15 kDa y Polybrene.

Preferiblemente, el método para transducir células de la presente invención comprende además poner en contacto las células con un poloxámero que tiene un peso molecular de 12,8 kDa a aproximadamente 15 kDa.

El término “poloxámero” es bien conocido en la técnica y se refiere a un copolímero tribloque no iónico compuesto por una cadena hidrófoba central de polioxipropileno flanqueada por dos cadenas hidrófilas de polioxietileno. El copolímero de bloque puede representarse mediante la siguiente fórmula:

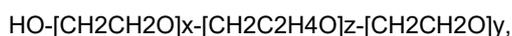


en la que z es un número entero de modo que la base hidrófoba representada por $(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})$ tiene un peso molecular de al menos 2250 Da y x o y es un número entero de aproximadamente 8 a 180 o más. Los poloxámeros también se conocen con el nombre comercial de “Pluronic” o “Syneronic” (BASF). Las longitudes de los bloques de polímero pueden personalizarse; como resultado, existen muchos poloxámeros diferentes. Un poloxámero que va a usarse según el método de la invención es un poloxámero que tiene un peso molecular de al menos 12,8 kDa a aproximadamente 15 kDa. Tal como resulta evidente a partir de la fórmula general anterior, los poloxámeros que tienen un peso molecular correspondiente pueden componerse cambiando la longitud de los bloques de polímero que forman un poloxámero. Por ejemplo, dos poloxámeros pueden tener aproximadamente el mismo peso molecular pero son estructuralmente diferentes, porque un poloxámero puede tener más repeticiones del polímero de bloque hidrófobo y menos repeticiones del polímero de bloque hidrófilo, mientras que el otro poloxámero tiene más repeticiones de los polímeros de bloque hidrófilos y menos repeticiones del polímero de bloque hidrófobo. Por ejemplo, z puede estar en el intervalo de 42 a 52, tal como al menos (para cada valor) 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 o al menos 52; y $x+y$ puede estar en el intervalo de 220 a 360, tal como al menos (para cada valor) 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, o al menos 350. Preferiblemente, z está en el intervalo de 44 a 50 y $x+y$ está en el intervalo de 235 a 266. Como la síntesis de copolímeros de bloque no puede ser precisa, los valores dados anteriormente pueden no ser alcanzables exactamente con la síntesis y el valor promedio diferirá en cierta medida (tal como se describe en el presente documento). Preferiblemente, el poloxámero tiene un peso molecular de 12,8 a aproximadamente 14,9 kDa, de aproximadamente 13,2 a aproximadamente 14,9 kDa, de aproximadamente 13,4 a aproximadamente 14,9 kDa, o más preferido de aproximadamente 14,0 a aproximadamente 14,9 kDa, de aproximadamente 14,3 a aproximadamente 14,8 kDa, de aproximadamente 14,5 a aproximadamente 14,7 kDa, y lo más preferido de aproximadamente 14,6 kDa. Tal como entiende el experto en la técnica, el método puede realizarse usando una multitud de poloxámeros. Por tanto, el término “poloxámero” tal como se usa en el presente documento puede usarse indistintamente con el término “poloxámeros” (que representa una entidad de varios poloxámeros, también denominada mezcla de poloxámeros) si no se establece explícitamente lo contrario. Tal como se señala en el presente documento, la síntesis de poloxámeros es inexacta, lo que da como resultado una mezcla de poloxámeros con peso molecular variable. Por tanto, el término “promedio” en relación con el peso molecular de (un/unos) poloxámero(s) tal como se usa en el presente documento es una consecuencia de la incapacidad técnica para producir poloxámeros que tengan la misma composición y, por tanto, el mismo peso molecular. Por tanto, los poloxámeros producidos según los métodos del estado de la técnica estarán presentes como una mezcla de poloxámeros, mostrando cada uno de los cuales una variabilidad con respecto a su peso molecular, pero la mezcla en su conjunto promediará el peso molecular especificado en el presente documento. El experto en la técnica está en la posición de obtener poloxámeros que puedan usarse en el método de la invención. Por ejemplo, BASF y Sigma Aldrich proporcionan poloxámeros tal como se define en el presente documento. Los métodos para determinar el peso molecular son bien conocidos en la técnica y se describen en libros de texto convencionales de química. Experimentalmente, puede usarse cromatografía líquida de alta presión (HPLC) para determinar el peso molecular de un poloxámero.

Las partículas de vector lentiviral y el adyuvante, preferiblemente el poloxámero, pueden añadirse simultáneamente, por ejemplo, como mezcla, a las células diana o en modo secuencial, siempre que ambos compuestos estén simultáneamente en contacto con la célula diana para permitir la transducción. Preferiblemente, la célula diana, las partículas de vector lentiviral y el adyuvante (poloxámero) se ponen en contacto durante al menos 5 horas, tal como al menos 6, al menos 7, al menos 8, más preferiblemente al menos 9, al menos 10, al menos 11, y lo más preferido al menos 12 horas. También se prevén tiempos de contacto más largos tales como al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, o al menos 24 horas. Se prefiere la adición simultánea de las partículas de vector lentiviral y el adyuvante, preferiblemente el poloxámero.

El uso de poloxámeros, tal como se definió anteriormente en el presente documento, se ha encontrado previamente (documento WO2013/127964) que potencia significativamente la eficiencia de transducción de vectores retrovirales en células diana adherentes y en suspensión sin afectar esencialmente a su viabilidad. En resumen, usando vectores lentivirales pudo demostrarse que el poloxámero designado "Synperonic F108" (HO - [CH₂CH₂O]_x - [CH₂C₂H₄O]_z - [CH₂CH₂O]_y con x+y = 265,45 y z = 50,34 (Kabanov, A., Zhu, J. & Alakhov, V. Adv. Genet. 53, 231-261 (2005)); peso molecular promedio: 14,6 kDa) mostraba menos citotoxicidad que el potenciador de la transducción de última tecnología Polybrene (polimetobromuro de 1,5-dimetil-1,5-diaza-undeca-metilo) incluso a concentraciones 100 veces mayores que las de Polybrene y eficiencia de transducción potenciada (células T HEK293). De la forma más sorprendente, el efecto potenciador de la transducción del poloxámero usado no se confinó a tipos celulares específicos. Mientras que muchas líneas celulares tumorales establecidas han sido difíciles de infectar, pudo demostrarse en el documento WO2013/127964 que el uso de Synperonic F108 (peso molecular promedio de 14,6 kDa que consiste en 265 unidades de óxido de etileno (EO) hidrófilo y 50 unidades de óxido de propileno (PO) hidrófobo; definido adicionalmente a continuación) aumentó en gran medida las tasas de infección de líneas celulares de linfoma difíciles de transfectar.

Preferiblemente, el poloxámero tiene la fórmula



en la que x+y = 265,45 y z = 50,34 en promedio (Synperonic F108); o el poloxámero tiene la fórmula



en la que x+y = 236,36 y z = 44,83 en promedio (F98).

El poloxámero de la primera fórmula se conoce en la técnica como Synperonic F108 y se sintetiza como un granulado blanco con un peso molecular promedio de 14,6 kDa que consiste en aproximadamente 265 unidades de óxido de etileno (EO) hidrófilo y aproximadamente 50 unidades de óxido de propileno (PO) hidrófobo. Los copolímeros de bloque se sintetizan mediante la adición secuencial de monómeros de PO y EO en presencia de un catalizador alcalino, iniciado por la polimerización del bloque de PO seguido por el crecimiento de cadenas de EO en ambos extremos del bloque de PO. Puesto que la síntesis de copolímeros de bloque no puede ser exacta, las repeticiones de x+y y z se dan como promedios. Por consiguiente, y con respecto al término "en promedio", la definición dada anteriormente de Synperonic F108 incluye poloxámeros que se desvían de dicha mediana, es decir, incluye poloxámeros que se encuentran dentro de la desviación estándar de la media (promedio). Esta razón justifica su particularmente no problemática solubilidad en agua o tampón fosfato (Kabanov, A., Zhu, J. & Alakhov, V. Adv. Genet. 53, 231-261 (2005)). En disolución acuosa, se describen moléculas de poloxámero individuales denominadas unímeros para autoensamblarse como micelas con un núcleo de PO y una cubierta de EO. Synperonic F108 como poloxámero a modo de ejemplo que tiene un peso molecular dentro del intervalo definido en el presente documento ha demostrado en el documento WO2013/127964 que actúa como un potente potenciador de la eficiencia de la transducción en células diana, particularmente células diana que se sabe que son difíciles de transfectar.

El poloxámero de la segunda fórmula se conoce en la técnica como F98 (Kabanov, A *et al.* Advances in Genetics. 2005; 53: 231-261.) y, como el Synperonic F108, se usa preferiblemente según la invención. La definición en cuanto al término "en promedio" dada para Synperonic F108 también se aplica a F98.

Preferiblemente, dicho poloxámero se proporciona a una concentración de aproximadamente 50 a 5000 µg/ml.

El término "aproximadamente" tal como se definió anteriormente en el presente documento, se aplica, haciendo los cambios necesarios, a este aspecto.

Se prefiere particularmente una concentración de aproximadamente 100 a 4000 µg/ml, más preferiblemente de aproximadamente 200 a 3000 µg/ml, incluso más preferiblemente de aproximadamente 300 a 2000 µg/ml, incluso más preferiblemente de aproximadamente 400 a 1500 µg/ml y lo más preferiblemente de aproximadamente 450 a 1250 µg/ml. También se prefieren concentraciones de aproximadamente 600 a 1000 µg/ml, de 700 a 1000 µg/ml, de 800 a 1000 µg/ml, o de 900 a 1000 µg/ml. A las últimas concentraciones, los poloxámeros, tal como se define en el

presente documento, están en un estado fluido cuando se diluyen en agua o tampón fosfato. Tal como entenderá el experto en la técnica, transducir células con dichos poloxámeros puede ser a nivel práctico más conveniente ya que, por ejemplo, permite un manejo conveniente, tal como un pipeteo más fácil.

5 Los poloxámeros se disuelven preferiblemente en agua, tampón fosfato o directamente en medio de cultivo celular. Los poloxámeros pueden disolverse, por ejemplo, en agua o tampón fosfato para obtener disoluciones madre de 100 mg/ml que pueden diluirse hasta una concentración de trabajo dada. A concentraciones de más de 200 mg/ml, las disoluciones de poloxámero son de tipo gel. A concentraciones por debajo de 200 mg/ml, las disoluciones de poloxámero están en un estado fluido. Preferiblemente, las concentraciones son tales que el poloxámero se
10 proporciona en un estado fluido.

En un aspecto preferido adicional, las células diana se ponen además en contacto con una o más sustancias policatiónicas seleccionadas del grupo de polímeros policatiónicos o péptidos policatiónicos.

15 "Polímeros policatiónicos", según la presente invención, se refiere a polímeros cargados cuyas unidades de repetición portan una carga positiva, en los que la carga positiva en una unidad de repetición se origina de restos de nitrógeno protonados. Por ejemplo, en polietilénimina (PEI) el grupo cargado positivamente es el grupo imina. Otro ejemplo no limitativo de un polímero policatiónico es la sustancia Polybrene (polimetobromuro de 5-dimetil-1,5-diazaundecametileno, bromuro de hexadimetrino).

20 El término "péptidos policatiónicos" se refiere a péptidos cargados de manera positiva. Por ejemplo, la poli-L-lisina es un péptido policatiónico homopolimérico con la fórmula molecular de $(C_6H_{12}N_2O)_n$, en la que según la invención, pero sin limitación, n puede ser al menos 2, tal como al menos 20, preferiblemente entre 200 y 500, más preferido entre 500 y 2500.

25 En un aspecto preferido adicional del método para transducir células de la invención, el método comprende una etapa adicional de someter a espinoculación la partícula de vector lentiviral pseudotipada con las células antes de, de manera concomitante a o después de poner en contacto dicha célula diana con dicho adyuvante, que es preferiblemente poloxámero tal como se comentó anteriormente.

30 El término "someter a espinoculación" es bien conocido en la técnica y se refiere a la inoculación centrífuga de células diana con las partículas de vector lentiviral para asegurar un contacto próximo para la captación celular de las partículas virales. En la técnica se conocen bien y se han descrito protocolos de espinoculación, por ejemplo, para vectores lentivirales en Millington *et al.*, 2009 [44]. Una etapa de espinoculación puede ejecutarse antes de, de manera concomitante a o después de poner en contacto las células diana con dicho adyuvante, preferiblemente dicho poloxámero. Preferiblemente, la etapa de espinoculación se realiza después de poner en contacto las células diana con el adyuvante, preferiblemente dicho poloxámero.

35 La etapa de espinoculación aumenta además las tasas de transducción logradas con el método de la invención, particularmente en células que son difíciles de transfectar, tal como se muestra en el ejemplo 5.

40 En un aspecto preferido adicional del método para transducir células de la invención, las células que van a transducirse se seleccionan del grupo que consiste en células tumorales, células de linaje linfóide, células epiteliales, células neuronales y células madre y/o, preferiblemente, en el que las células que van a transducirse forman parte de una población celular heteróloga.

45 El término "célula tumoral" es bien conocido en la técnica y se refiere a una célula neoplásica implicada en la formación de tumores benignos, premalignos o malignos. Las células tumorales que son malignas se denominan generalmente células cancerosas y pueden tener la capacidad de metastatizar o diseminarse a tejido vecino. Las células tumorales preferidas son, por ejemplo, células tumorales pancreáticas (tal como, por ejemplo, células AsPC-1 y PANC-1), líneas celulares de linfoma (tales como, por ejemplo, células KARPAS-299, SUDHL-1, SUP-M2 y SR-786) y células de cáncer de mama (tal como, por ejemplo, células MCF7, MDA-MB-361 y T47D).

50 El término "células de linaje linfóide" se refiere a células que están implicadas en la generación de linfocitos y linfocitos *per se*. El término "linfocito" se refiere a linfocitos pequeños (linfocitos B y T, células plasmáticas) y linfocitos citolíticos naturales tal como se conoce bien en la técnica. Las células de linaje linfóide incluyen además, por ejemplo, células dendríticas linfoides, así como células progenitoras de linfocitos tales como prolinfocitos, linfoblastos, células progenitoras linfoides comunes.

55 El término "célula epitelial" es bien conocido en la técnica. Las células epiteliales revisten cavidades y superficies de estructuras en todo el cuerpo y también forman muchas glándulas. Los tejidos epiteliales pueden clasificarse en epitelio simple (espesor de una célula) y epitelio estratificado (varias capas de células). Las células epiteliales se clasifican además por su morfología en células epiteliales escamosas, cuboidales, columnares y pseudoestratificadas. Por ejemplo, el estómago y el intestino humano están revestidos de células epiteliales.
60 Además, las líneas celulares epiteliales incluyen también células de carcinoma de mama (tales como, por ejemplo, células MCF7, MDA-MB-361 y T47D) o células de la línea celular HEK293T.
65

Las "células neuronales" son bien conocidas en la técnica y son células que son eléctricamente excitables transmitiendo información por señalización eléctrica y química. Existen diversas células neuronales especializadas tales como, por ejemplo, neuronas sensoriales y neuronas motoras. Por ejemplo, pueden usarse células en cesta, las células de Betz, neuronas espinosas medianas, células de Purkinje, células piramidales, células de Renshaw, células granulares o células del asta anterior como células diana según la invención. Una "célula tumoral neuronal" es una célula tumoral de origen neuronal, por ejemplo, gliomas, meduloblastoma, astrocitoma y otros cánceres derivados del linaje neuronal. Las líneas celulares de glioma (tales como, por ejemplo, U87 y LN18) pueden usarse en los métodos descritos en el presente documento.

El término "célula madre" es bien conocido en la técnica y se ha detallado anteriormente en el presente documento. Las células madre preferidas para su uso según el método de la invención son, por ejemplo, células madre embrionarias, células madre pluripotentes inducidas, células madre hematopoyéticas, células madre cancerosas.

Todos estos tipos celulares se consideran normalmente difíciles de transfectar o transducir pero pueden transducirse ahora de manera más eficaz basándose en el método de la presente invención.

Además, o de manera preferida, las células que van a transducirse pueden ser parte de una población celular heterogénea, es decir, una población celular que comprende diferentes tipos celulares (también denominada en el presente documento "población mixta"). Tal como se muestra en los ejemplos adjuntos, en particular en el ejemplo 4 y 6, la transducción se potencia específicamente en células que portan una molécula diana a la que puede unirse el dominio de unión a la membrana celular. En una población celular mixta que contiene células con y sin una molécula diana de este tipo, el equilibrio de transducción se desplaza hacia las células que portan dicha molécula diana. Por tanto, se ha demostrado una ganancia de especificidad relativa de las partículas lentivirales redirigidas hacia sus células diana incluso en presencia de células no diana de competición en el presente documento.

La presente invención se refiere además a un kit que comprende:

(a) una molécula de ácido nucleico tal como se define por las reivindicaciones y una molécula de ácido nucleico que comprende o que consiste en una secuencia de ácido nucleico que codifica para una VSV-G nativa, en la que la razón de la molécula de ácido nucleico tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 con respecto a la molécula de ácido nucleico que comprende o que consiste en una VSV-G nativa está en el intervalo entre de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 90% y de aproximadamente el 50% a aproximadamente el 50%, de aproximadamente el 10% : aproximadamente el 90% a aproximadamente el 50% : aproximadamente el 50%, en la que el término "aproximadamente" es una desviación con respecto a estos porcentajes de hasta el 5%; y/o

(b) una partícula de vector lentiviral pseudotipada de la invención;

y, opcionalmente, instrucciones de uso.

Los diversos componentes del kit pueden empaquetarse en uno o más recipientes, tal como uno o más viales. Los viales pueden, además de los componentes, comprender conservantes o tampones para almacenamiento, medios para mantenimiento y almacenamiento, por ejemplo medios celulares ES, DMEM, MEM, HBSS, PBS, HEPES, higromicina, puromicina, disolución de penicilina-estreptomina, gentamicina, entre otros. Ventajosamente, el kit comprende instrucciones para el uso de los componentes que permiten al experto trabajar convenientemente, por ejemplo, diversas realizaciones de la invención. Cualquiera de los componentes puede emplearse en un contexto experimental.

Las definiciones y realizaciones preferidas descritas anteriormente en el presente documento con respecto a la molécula de ácido nucleico tal como se define por las reivindicaciones o la partícula de vector lentiviral pseudotipada de la invención se aplican haciendo los cambios necesarios a los componentes del kit de la invención. Por ejemplo, la partícula de vector lentiviral pseudotipada de la invención puede combinarse con un poloxámero, tal como se describió anteriormente en el presente documento. Para dar otro ejemplo, las razones preferidas entre la proteína de fusión de VSV-G de la divulgación y una VSV-G que no está unida a un dominio de unión a la membrana celular se aplican igualmente a las razones para los componentes del kit según la opción (a)(ii). Por tanto, se prefiere particularmente incluir en el kit una molécula de ácido nucleico tal como se define en las reivindicaciones en una cantidad del 33% de la cantidad total de VSV-G y una molécula de ácido nucleico que comprende o que consiste en una secuencia de ácido nucleico que codifica para una VSV-G nativa en una cantidad del 67% de la cantidad total de VSV-G.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. En caso de conflicto, prevalecerá la memoria descriptiva de la patente, incluyendo las definiciones.

Leyenda de las figuras

Figura 1: Diseño y producción de partículas lentivirales que contienen fusiones scFv-VSV-G. Plásmidos de VSV-G utilizados para la producción de lentivirus nativa (wt) y al que se le ha añadido scFv: para obtener especificidad de CD30 o EGFR, se clonó un fragmento de anticuerpo scFv contra cualquier antígeno entre la secuencia señal (SS) y la secuencia de proteína de VSV-G. Para fines de detección, se fusionó una etiqueta His con el extremo N-terminal. Abreviaturas: VSV-G - glicoproteína G de la envuelta del virus de la estomatitis vesicular; His6 - etiqueta His que consiste en seis residuos de histidina; VH/VL - cadena pesada/ligera variable.

Figura 2: Transducción de EGFR + células HEK293T con diferentes razones de partículas lentivirales a las que se les añadió scFv- α EGFR. (a) Rendimientos de seis partículas lentivirales diferentes que codifican para copGFP que se produjeron usando diferentes razones de plásmidos de empaquetamiento que codifican para VSV-G wt y scFv- α EGFR-VSV-G. (b) Ensayo de inmunotransferencia de partículas lentivirales redirigidas a anticuerpos (vscFv- α EGFR-VSV-G al 33%, carril derecho) por medio de la etiqueta His (84 kDa). El 100% de las partículas lentivirales de VSV-G wt (carril izquierdo) y la proteína núcleo p24 lentiviral (24 kDa) sirvieron como referencia. (c) Análisis FACS de la expresión de EGFR en la superficie de células HEK293T. (d) Análisis FACS de la expresión de GFP en células HEK293T transducidas con diferentes razones (como en a) de partículas lentivirales a las que se les añadió scFv a MOI 1 (MFI - mediana de intensidad de fluorescencia). (e) Cuantificación estadística de los experimentos de transducción en células HEK293T realizados tal como se describe en (d) (tres experimentos diferentes, media \pm DE, * p < 0,05, mediante prueba de la t).

Figura 3: Factores que afectan a la transducción lentiviral redirigida con anticuerpos. (a) Análisis FACS de la expresión de EGFR en la superficie de células T47D (EGFR+) y ZR75 (EGFR-). (b+c) Cuantificación de la expresión de GFP después de la transducción de células T47D (b) y ZR75 (c) con diferentes tipos de razón de partículas lentivirales a las que se les añadió scFv que codifican para copGFP a MOI 1. (d) Cuantificación de experimentos de transducción en células T47D incubadas con partículas lentivirales wt y a las que se les añadió scFv- α EGFR (MOI 1) que portan un enlazador de fusión entre el fragmento de anticuerpo scFv y VSV-G o que no portan un enlazador de fusión de este tipo (tres experimentos diferentes, media \pm DE, * p < 0,05, mediante prueba de la t).

Figura 4: Transducción de células de linfoma CD30+ con partículas lentivirales a las que se les añadió scFv- α CD30. (a) Análisis FACS de la expresión de CD30 en la superficie de células KARPAS-299, SUP-M2, SUDHL1 y HEK293T. (b-e) Cuantificación de experimentos de transducción en células descritas incubadas con MOI 10 y 1 de partículas lentivirales que codifican para copGFP con o sin espinoculación, adyuvante a base de poloxámero y VSV-G a la que se le añadió scFv- α CD30 (tres experimentos diferentes, media \pm DE, * p < 0,05, ** p < 0,01 mediante prueba de la t).

Figura 5: Transducción de células diana a las que se les añadió scFv-VSV-G en presencia de células no diana en un ensayo de transducción competitivo. (a) Análisis FACS de la expresión de CD30 en la superficie de células de leucemia HL60. (b) Se mezclaron células KARPAS-299 y HL60 o (c) células ZR75 y T47D en números de células iguales y se transdujeron con (izquierda) partículas lentivirales wt y (derecha) el 33% de partículas lentivirales a las que se les añadió scFv-VSV-G a MOI 1. En transferencias puntuales citofluorimétricas (FSC frente a expresión de CD30 o EGFR) podían distinguirse dos poblaciones: células CD30-HL60 y CD30+KARPAS-299 en (b) o células EGFR-ZR75 y EGFR+T47D en (c). En transferencias puntuales inferiores (expresión de GFP frente a FSC), las poblaciones celulares activadas se analizaron para determinar la expresión de copGFP. Los gráficos representan un experimento de tres réplicas realizadas.

Ejemplos

Los ejemplos ilustran la invención:

Ejemplo 1: Materiales y métodos

Líneas celulares

Se hicieron crecer células humanas embrionarios de riñón HEK293T en medio DMEM complementado con suero bovino fetal al 10% (FCS, Pan Biotech, Aidenbach, Alemania) y glutamina 2 mM. Las líneas celulares de linfoma anaplásico de células grandes KARPAS-299, SUDHL-1 y SUP-M2, y la línea celular de leucemia promielocítica HL60 se cultivaron en medio RPMI 1640 complementado con FCS al 10% y glutamina 2 mM. Las líneas celulares de tumor de mama epitelial ZR75 y T47D se hicieron crecer en medio RPMI con FCS al 10%, glutamina 2 mM e insulina bovina 0,2 U/ml (Cell Applications Inc, San Diego, CA).

Modificación por ingeniería genética de plásmidos scFv- α CD30-/scFv- α EGFR-VSV-G

Se añadió un sitio de restricción MfeI mediante PCR propensa a errores en el SS de VSV-G (serotipo Indiana) disponible en el vector de empaquetamiento pMD2.G (disponible de, por ejemplo, Addgene.org). Para introducir una etiqueta His en el extremo N-terminal, se amplificó ADNc de scFv- α CD30 y scFv- α EGFR (estas secuencias pueden pedirse de proveedores tales como, por ejemplo, GeneArt®) con un cebador directo MfeI con etiqueta His

(5'GCGACCAATTGCCATCATCATCATCATGCCAGGT CAAGCTGCAGGAGTGGACTGAACTGGCAAAG; SEQ ID NO: 11) y un cebador inverso, incluyendo la mitad de una secuencia enlazadora (enlazador flexible: GGGSGGGSSGGGS) que alberga un sitio XhoI (5'GTAATCTCGAGCCACCTCCTGAACCGCCTCCCGTTTGATTCCAGCTT GGTGCCACACCGAACGTGGCG; SEQ ID NO: 12). Cuando se añade, la otra mitad del enlazador se unió al extremo N-terminal de VSV-G mediante PCR (5'GTTATCTCGAGCGGAG GCGGTTCAAAGTTCCACCATAGTTTTTCCACACAACAAAAGAACTG (SEQ ID NO: 13) y 5'GTATTACCGTTCTGGGTTTTTAGGAGCAAGATAGCTGAGATCCACTG (SEQ ID NO: 14) usando el sitio de restricción AgeI dentro de VSV-G). Ambos productos se digirieron dos veces con o bien MfeI/XhoI o bien XhoI/AgeI, y volvieron a insertarse en pMD2.G (linealizado por digesto MfeI/AgeI). Se adquirieron enzimas de restricción FastDigest de Fermentas (Vilna, Lituania); se obtuvieron oligonucleótidos de Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Alemania).

Producción de lentivirus

El vector de transducción lentiviral pGreenPuro (System Biosciences, Mountain View, CA, EE.UU.) permite la expresión de copGFP impulsada por un promotor interno de CMV. Las partículas lentivirales defectuosas en la replicación se produjeron mediante la cotransfección transitoria de células HEK293T en placas de Petri de 10 cm con 8 µg de pGreenPuro, 16 µg y 8 µg de plásmidos de empaquetamiento pMDLg/pRRE y pRSV.Rev (disponibles de, por ejemplo, Addgene.org), y 4 µg de razones variables de pMD2.G, pMD2.G scFv-αCD30 o -αEGFR. Para la transfección, se utilizó Lipofectamine 2000 (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE. UU.) según las instrucciones del fabricante. Las partículas virales se recogieron 48 h después de la transfección, se eliminaron los restos celulares mediante centrifugación a baja velocidad y se filtraron usando filtros Stericup de 0,45 µm. El sobrenadante de lentivirus se concentró por ultrafiltración usando columnas Amicon-20 (Millipore, Billerica, MA, EE.UU.) tal como se describió previamente [24]. Se almacenaron alícuotas concentradas de lentivirus a -80°C. Los títulos de virus (partículas de virus por ml de alícuota concentrada) se determinaron mediante ELISA p24 de cuantificación de lentivirus QuickTiter™ (BioCat, Heidelberg, Alemania) según el protocolo de la empresa utilizando alícuotas de lentivirus diluidas en serie.

Ensayo de inmunotransferencia

Para la preparación de la proteína viral, se desnaturalizaron 2 µl de disolución concentrada de lentivirus mediante incubación durante 10 minutos a 95°C en tampón de muestra de urea (el 5% de dodecil sulfato de sodio (SDS), urea 8 M, Tris-HCl 200 mM, EDTA 0,1 mM, el 0,03% de azul de bromofenol, el 2,5% de ditiotretol, pH 8,0) [25]. Las muestras se fraccionaron en geles de poli(acrilamida) de SDS (14%) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (GE Healthcare, Little Chalfont, RU). Se detectaron scFv-αCD30-VSV-G o scFv-αEGFR-VSV-G con etiqueta His usando anticuerpo anti-His de ratón (clon 13/45/31, Dianova, Hamburgo, Alemania) seguido de un anticuerpo de ratón conjugado anti-peroxidasa de rábano picante (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE. UU.). La proteína núcleo lentiviral p24, detectada con un anticuerpo de ratón (BioCat, Heidelberg, Alemania), se utilizó como referencia interna para proteínas lentivirales. Las membranas transferidas se desarrollaron con el sistema de detección de inmunotransferencia de tipo Western ECL Advance (GE Healthcare) según lo recomendado por el proveedor.

Transducción lentiviral

Se cubrieron células HEK293T, ZR75 y T47D (2×10^5 células por pocillo) con 1 ml de medio que contenía lentivirus con o sin 10 µl de adyuvante químico a base de poloxámero (LentiBoost™ Sirion Biotech GmbH, Martinsried, Alemania) [23] a diferente MOI (partículas lentivirales por célula). Después de una incubación de 24 h a 37°C y el 5% de CO₂, se cambió el sobrenadante por medio nuevo y se incubó durante 24 h adicionales.

Se resuspendieron células KARPAS 299, SUDHL-1 o SUP-M2 en suspensión (10^6 células por pocillo) en 1 ml de medio que contenía lentivirus. Se centrifugaron las placas a 800 g durante 90 min (espinoculación). Se lavaron y se resuspendieron células SUDHL-1 en medio nuevo directamente después de la espinoculación y se incubaron durante 48 h. Tras la centrifugación, se incubaron células KARPAS-299, SUP-M2 y HL60 durante la noche en 1 ml de medio que contenía lentivirus, luego se lavaron, se resuspendieron en medio de cultivo nuevo y se incubaron durante 24 h adicionales. Para ensayos de competición, se resuspendieron mezclas de 5×10^5 células KARPAS-299 y 5×10^5 células HL60 o 10^5 células T47D y 10^5 células ZR75 en 1 ml de medio que contenía lentivirus con el adyuvante a base de poloxámero LentiBoost. Se centrifugaron las células en suspensión a 800 g durante 90 min y se incubaron durante la noche, luego se lavaron y se incubaron de nuevo durante 24 h.

Análisis citofluorimétrico

Después de la transducción lentiviral, las células se lavaron y se resuspendieron en PBS. Se analizaron 30.000 eventos para determinar las características de dispersión hacia adelante y hacia los lados y para la emisión de luz fluorescente verde a 530 nm usando FACSDiva (BD Biosciences, Heidelberg, Alemania). La mediana de intensidad fluorescente (MFI) cuantifica el cambio en la intensidad de fluorescencia de las células transducidas.

Para la detección de la expresión de superficie de CD30 o EGFR, se lavaron 10^6 células dos veces con PBS complementado con FCS al 2% y se incubaron en $100 \mu\text{l}$ de disolución de anticuerpo (1:20 en PBS + FCS al 2%; anticuerpo αCD30 o αEGFR conjugado con FITC y control de isotipo, Dako, Dinamarca; anticuerpo αCD30 o αEGFR conjugado con PE, BioLegend, San Diego, CA, EE.UU.) durante 1 h sobre hielo. Antes de la detección citométrica (FITC: 530 nm; PE: 610 nm), las células se lavaron dos veces y se resuspendieron en PBS + FCS al 2%.

Análisis estadístico

10 Todos los experimentos se realizaron con réplicas técnicas por duplicado y biológicas por triplicado. Los valores medios \pm desviación estándar (DE) se representan a menos que se indique lo contrario. Los resultados obtenidos se evaluaron estadísticamente utilizando la prueba t con la ayuda del software estadístico SigmaPlot (Systat Software Inc, San José, CA). La significación estadística se consideró en niveles * $p < 0,05$.

15 Ejemplo 2: Diseño y producción de partículas lentivirales que contienen fusiones scFv-VSV-G

Para la producción de partículas lentivirales pseudotipadas de VSV-G, las células HEK293T se transfectaron de manera transitoria con una mezcla de cuatro plásmidos que contenía un vector de expresión lentiviral que expresa copGFP y tres plásmidos de empaquetamiento, uno de los cuales codifica para VSV-G (pMD2.G). Para incorporar un fragmento de anticuerpo de cadena sencilla que reconoce CD30 o EGFR (scFv- αCD30 o - αEGFR) respectivamente, se diseñó una novedosa proteína de fusión de VSV-G, que contenía una etiqueta His N-terminal seguida del fragmento de anticuerpo scFv y un enlazador flexible (GGGSGGGSSGGGS) insertado entre la secuencia señal (SS) y el extremo N-terminal de VSV-G de longitud completa (figura 1). Para determinar la configuración óptima del vector lentiviral, se generaron partículas lentivirales redirigidas a scFv que codifican para GFP con diferentes razones estequiométricas de plásmidos pMD2.G que codifican para o bien VSV-G nativa (wt) o bien VSV-G a la que se le añadió scFv- αEGFR . Las partículas redirigidas a anticuerpos con el 10, el 20, el 33 y el 67% de scFv- αEGFR -VSV-G pudieron producirse con rendimientos comparables (cuantificados en ensayos ELISA que detectan la proteína núcleo lentiviral p24) (figura 2a). Las altas razones de plásmidos que codifican para scFv- αEGFR -VSV-G en la mezcla de producción dieron como resultado rendimientos más bajos en comparación con las producciones LV de VSV-G wt. La incorporación de scFv- αEGFR -VSV-G en partículas lentivirales se demostró por inmunotransferencia de partículas pseudotipadas de scFv-VSV-G. Aunque se observó una posible acumulación de VSV-G unida a la membrana (nube blanca), pudo detectarse una banda clara para scFv- αEGFR -VSV-G con etiqueta His (figura 2b).

35 Ejemplo 3: Transducción de células EGFR⁺ HEK293T con diferentes razones de partículas lentivirales a las que se les añadió scFv- αEGFR

Se sometieron a prueba partículas redirigidas a anticuerpos que codifican para GFP para determinar su capacidad para infectar células EGFR⁺ HEK293T en ensayos citométricos (figura 2c-e) a MOI 1. Aunque las partículas lentivirales de VSV-G wt pudieron infectar el 24,1% de células HEK293T, las partículas lentivirales a las que se les añadió scFv-VSV-G pudieron potenciar significativamente las tasas de infección hasta 2,5 veces (el 62,3% para partículas con el 33% de scFv- αEGFR -VSV-G). Las partículas lentivirales redirigidas a anticuerpos que portan el 67% de scFv- αEGFR -VSV-G sólo fueron la mitad de infecciosas (13,4%) que las partículas lentivirales de VSV-G wt y las partículas lentivirales de scFv- αEGFR -VSV-G homotípicas (100%) no fueron infecciosas (figura 2 d, e).

45 Ejemplo 4: Factores que afectan la transducción lentiviral redirigida con anticuerpos

Las partículas lentivirales que presentan scFv- αEGFR -VSV-G pudieron infectar células EGFR⁺ HEK293T. Para comprobar la especificidad de las tasas de transducción potenciadas, se usaron tanto células de cáncer de mama T47D que expresan antígeno como células ZR75 negativas a antígeno, como modelos celulares (figura 3a). En células T47D, el 33% de las partículas lentivirales de scFv- αEGFR -VSV-G mostraron el mejor rendimiento, potenciando las tasas de infección 2 veces (67,5%) en comparación con partículas lentivirales de VSV-G wt (33,7%). Tal como se observó anteriormente, las producciones de virus que contienen mayores cantidades de plásmido de VSV-G a la que se le añadió scFv (100%) no pudieron infectar células EGFR⁺ en ensayos citométricos (figura 3b). La transducción de células EGFR-ZR75 con el 33% partículas lentivirales de scFv- αEGFR -VSV-G no dio como resultado una tasa de transducción aumentada (figura 3c), lo que demuestra que el efecto potenciador de partículas lentivirales dirigidas a scFv se correlaciona con la presencia de antígeno en la superficie de la célula diana.

60 Tanto el tamaño de los dominios de proteínas fusionadas como el mecanismo de unión son importantes para el plegamiento y la función adecuados de las proteínas de fusión recombinantes. Para evaluar el papel del enlazador de fusión (13 aminoácidos: GGGSS GGGSS GGGSS) se diseñó una scFv- αEGFR -VSV-G sin una secuencia enlazadora que separa la secuencia de cadena ligera variable del fragmento de anticuerpo scFv- αEGFR y la secuencia génica de VSV-G (véase la figura 1a). Producir el 33% de partículas lentivirales de scFv- αEGFR -VSV-G sin un enlazador de fusión condujo a una fuerte disminución en las producciones de virus en comparación con el 33% de producción de partículas lentivirales de scFv- αEGFR -VSV-G ($2,5 \times 10^8$ frente a $9,1 \times 10^8$ partículas de virus por

ml). Las partículas redirigidas a anticuerpos sin enlazadores de fusión no lograron aumentar las tasas de transducción de las células T47D (figura 3d). Se concluye que una secuencia enlazadora entre el anticuerpo y VSV-G media la funcionalidad mejorada de las partículas lentivirales redirigidas a scFv-VSV-G.

5 Ejemplo 5: Protocolo de transducción optimizado para células de linfoma CD30⁺

Los bajos títulos de infección LV (MOI 2 o menos) son suficientes para transducir la mayoría de las células epiteliales adherentes. Sin embargo, en células en suspensión y células hematopoyéticas, por ejemplo, células de linfoma, incluso los altos títulos LV (MOI 10) transducen sólo una parte de la población celular. Por tanto, se desarrolló un protocolo de infección optimizado mediante la combinación de espinoculación, un adyuvante químico a base de poloxámero y envueltas de VSV-G redirigidas a scFv. Las células de linfoma KARPAS-299, SUP-M2 y SUDHL-1 expresan altos niveles de CD30 en superficie en comparación con células CD30⁻ HEK293T (figura 4a). La transducción convencional de células de linfoma a MOI 10 dio como resultado tasas de transducción del 20% al 40% (figura 4b-d). Añadir espinoculación y adyuvantes químicos conduce a un aumento de la infección lentiviral. Además, la modificación del 33% de la superficie lentiviral con scFv- α CD30-VSV-G llevó las tasas de transducción a niveles superiores al 90% (mejora 4 veces mayor con respecto a VSV-G wt para células SUDHL-1) a MOI 10. Incluso cuando los títulos de partículas lentivirales se redujeron a MOI 1, el 50% de las células de linfoma pudieron transducirse con este protocolo de transducción. En comparación con el protocolo de la técnica anterior, se obtuvo así un aumento de la eficiencia de más de 10 veces con el sistema optimizado. En cambio, las células CD30⁻ HEK293T no pudieron beneficiarse de la modificación de la superficie lentiviral, lo que subraya la necesidad de una presencia específica de antígeno. Estos datos se correlacionan con los efectos sobre células EGFR⁻ ZR75 cuando se usó lentivirus al que se le añadió scFv-aEGFR-VSV-G (figura 3c). Para todos los tipos celulares sometidos a prueba, el uso de vectores lentivirales pseudotipados con el 33% de scFv-VSV-G produjo los mejores resultados de transducción.

25 Ejemplo 6: Transducción de células diana a las que se les añadió scFv-VSV-G en presencia de células no diana

En cultivo monotípico, las partículas lentivirales redirigidas a scFv pudieron transducir células de linfoma y células epiteliales tumorales de manera más eficaz que los vectores pseudotipados con VSV-G. La especificidad se sometió a prueba adicionalmente en dos experimentos de transducción celular competitiva: en primer lugar, se cultivaron conjuntamente células EGFR⁺ T47D y EGFR⁻ ZR75 (figura 5a). En segundo lugar, se mezclaron células CD30⁺ KARPAS-299 con células CD30⁻ HL60 de leucemia promielocítica, ambas cultivadas en suspensión (figura 5b, c). Ambas mezclas se infectaron con o bien el 100% de partículas lentivirales de VSV-G wt o bien el 33% de scFv- α CD30-VSV-G a MOI 1 en condiciones optimizadas (+ espinoculación, + adyuvante a base de poloxámero). Utilizando el 100% de partículas lentivirales de VSV-G wt, cada una de las mezclas celulares mostró tasas de transducción comparables mediante análisis FACS (el 24,8% de células ZR75 transducidas y el 27,3% de células T47D transducidas en la primera configuración, y el 37,1% de células HL-60 transducidas y el 36,3 % de células KARPAS-299 transducidas en la segunda configuración). En general, en experimentos que usan células de linfoma en suspensión y células HL60, se midieron valores más bajos de MFI (mediana de intensidad de fluorescencia) de expresión de GFP en comparación con la transducción de células adherentes T47D y ZR75.

En ambos casos, el equilibrio de transducción se desplazó hacia el tipo celular positivo a antígeno dentro de una mezcla (el 61,9% de células EGFR⁺ T47D frente al 17,1% de células EGFR⁻ ZR75 transducidas y el 72,2% de células CD30⁺ KARPAS-299 frente al 16,5% de células CD30⁻ HL60 transducidas, respectivamente) cuando se usaron partículas lentivirales redirigidas a scFv. Estos hallazgos demuestran una ganancia de especificidad relativa de las partículas lentivirales redirigidas a anticuerpos hacia sus células diana incluso en presencia de células no diana de competición.

50 Ejemplo 7: Discusión

Se ha desarrollado un novedoso tipo de partícula lentiviral, que porta glicoproteínas VSV-G redirigidas a scFv que presentan fragmentos de anticuerpos de cadena sencilla fusionados con un enlazador (scFv) contra el antígeno tumoral de linfoma CD30 o el antígeno tumoral epitelial amplio EGFR. Cuando se combina con la espinoculación y un adyuvante a base de poloxámero, se lograron altas tasas de transducción en células positivas a antígeno a una MOI baja.

Pueden usarse diversos adyuvantes químicos para potenciar la transferencia de genes lentivirales, incluyendo polímeros catiónicos o sustancias químicas a base de lípidos que neutralizan las cargas de la membrana [26-28]. Para aplicaciones clínicas, los protocolos de transducción de lentivirus a menudo se basan en el uso del potenciador de la transducción retroviral retronectina, un fragmento derivado de fibronectina [29]. Se notificó que la retronectina promovía la actividad de vectores pseudotipados con GALV y pseudotipados con RD114, pero en menor grado que la transducción de vectores pseudotipados con VSV-G [22, 30, 31]. Además, la dosificación de retronectina para células en suspensión es difícil debido a su actividad basada en la superficie.

La búsqueda de nuevos adyuvantes adecuados para protocolos de transducción clínica de vectores lentivirales condujo a los descubrimientos recientes del péptido catiónico Vectofusin-1 y el poloxámero anfífilo Pluronic® F-108

(poli(etilenglicol)-bloque-poli(propilenglicol)-bloque-poli(etilenglicol) que tiene un peso molecular promedio de ~14.600 (Sigma Aldrich), que muestra una administración mejorada de genes a células CD34⁺ hematopoyéticas y células T primarias [32, 23]. Para el poloxámero F108, los niveles de toxicidad son bajos incluso a altas concentraciones (> 5 mg/ml) y hay un archivo maestro de medicamentos de la FDA disponible para el poloxámero 338 con la composición química idéntica disponible de BASF (Kolliphor P 338).

En el pasado, los estudios de redireccionamiento a anticuerpos se habían llevado a cabo utilizando retrovirus que muestran anticuerpos fusionados con otras glicoproteínas o con aproximaciones basadas en conjugados [33-36]. Los estudios basados en VSV-G aprovechan las ventajas de VSV-G como una potente glicoproteína en cuanto a estabilización del ensamblaje de partículas y la capacidad de fusión de membrana [37], que puede mantenerse después de la inserción de nuevos dominios de proteínas en el extremo N-terminal de VSV-G [38, 39]. Al añadir un dominio de unión a colágeno [11], un dominio ZZ de unión a antígeno [12] o un sitio de unión a fibrinógeno [13] al extremo N-terminal de la VSV-G, pudieron inmovilizarse partículas lentivirales modificadas (algunas como mezclas con VSV-G wt) en matrices recubiertas de colágeno/anticuerpo o hidrogeles de fibrina. Posteriormente, las células cultivadas en las matrices unidas al virión se transdujeron hasta 5 veces más eficientemente. Debido al tráfico de membrana sensible a la temperatura de VSV-G modificada durante la producción de partículas en un estudio [11], los títulos aceptables sólo se pudieron lograr a 30°C. Estos métodos demuestran una inmovilización potenciada de partículas virales y, por tanto, una captación viral controlada espacialmente aumentada cuando las células adherentes se pusieron en contacto cercano con viriones inmovilizados y Polybrene, pero no alteran la especificidad de la partícula lentiviral en sí.

Para aumentar la selectividad de partículas lentivirales, Kaikkonen *et al.* [40] fusionaron estreptavidina con el dominio transmembrana de VSV-G en envueltas pseudotipadas con gp64 para inducir la unión basada en conjugado de anticuerpos α EGFR y α CD46-avidina. Esto dio como resultado tasas de transducción 2 veces mayores en líneas celulares de cáncer de pulmón, hígado y ovario adherentes a MOI de 0,2 a 1,2 en presencia de Polybrene. Sin embargo, una aproximación de unión no covalente como esta puede tener limitaciones ya que los adaptadores de anticuerpo biotinilados son propensos a disociación debido a actividad biotinidasa en suero [41].

Dreja y Piechaczyk [14] añadieron una secuencia señal extraña fusionada con un fragmento de anticuerpo scFv dirigido contra CMH-I humano expresado ubicuamente en el extremo N-terminal de la VSV-G de longitud completa (sin enlazador). Mostraron formación y unión celular de partículas lentivirales redirigidas a anticuerpos, pero lograron pocos títulos y baja infectividad de células humanas. Lograron una selectividad 5 veces mayor para la transducción de células humanas (no se indica MOI) en comparación con partículas lentivirales de VSV-G que portan un fragmento de anticuerpo scFv que no se une en presencia de Polybrene. Los resultados respaldan estos hallazgos ya que las partículas de VSV-G a las que se les añadió scFv homotípicas (100%) no pudieron transducir las células diana a MOI 1. Los fragmentos de anticuerpos pueden enmascarar el sitio de unión al receptor de VSV-G o la interferencia espacial puede conducir a una capacidad de fusión inhibida de VSV-G [42, 43].

En el presente estudio, la especificidad pudo aumentarse a altas tasas de transducción produciendo partículas lentivirales que presentan una mezcla de VSV-G wt y VSV-G a la que se le añadió scFv. En todos los experimentos, se obtuvieron los mejores resultados a una razón del 33% para VSV-G a la que se le añadió scFv. En combinación con la espinoculación y un adyuvante químico a base de poloxámero, pudo obtenerse una transducción 4 veces mayor de las células de linfoma positivas a antígeno, incluso en presencia de células HL 60 no diana.

45 Conclusión

La estrategia de fusión scFv-VSV-G recombinante tal como se describe en el presente documento, y en particular la estrategia preferida en los ejemplos anteriores, puede adaptarse fácilmente a diferentes antígenos celulares alterando la afinidad del fragmento de anticuerpo scFv. Se logró un aumento significativo de las tasas de administración de genes en combinación con espinoculación y adyuvantes químicos en modelos celulares no adherentes de exposición, lo que es beneficioso para aplicaciones industriales y farmacéuticas de lentivirus.

Bibliografía adicional

- 55 1. Bukrinsky MI, Haggerty S, Dempsey MP, Sharova N, Adzhubel A, Spitz L *et al.* A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells. *Nature* 1993;365:666-669.
- 60 2. Gaspar HB, Cooray S, Gilmour KC, Parsley KL, Zhang F, Adams S *et al.* Hematopoietic stem cell gene therapy for adenosine deaminase-deficient severe combined immunodeficiency leads to long-term immunological recovery and metabolic correction. *Sci Transl Med* 2011;3:97ra80.
3. Gaspar HB, Cooray S, Gilmour KC, Parsley KL, Adams S, Howe SJ *et al.* Long-term persistence of a polyclonal T cell repertoire after gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *Sci Transl Med* 2011;3:97ra79.
- 65 4. Lamb LS, Bowersock J, Dasgupta A, Gillespie GY, Su Y, Johnson A *et al.* Engineered drug resistant $\gamma\delta$ T cells kill glioblastoma cell lines during a chemotherapy challenge: a strategy for combining chemo- and immunotherapy. *PLoS*

- One 2013;8(1):e51805.
5. Chen F, Cai B, Gao Y, Yuan X, Cheng F, Wang T *et al.* Suicide gene-mediated ablation of tumor-initiating mouse pluripotent stem cells. *Biomaterials* 2013;34(6):1701-1711.
- 5 6. Finkelshtein D, Werman A, Novick D, Barak S, Rubinstein M. LDL receptor and its family members serve as the cellular receptors for vesicular stomatitis virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110(18):7306-7311.
7. Burns JC, Friedmann T, Driever W, Burrascano M, Yee JK. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:8033-8037.
- 10 8. Li Y, Drone C, Sat E, Ghosh HP. Mutational analysis of the vesicular stomatitis virus glycoprotein G for membrane fusion domains. *J Virol* 1993;67:4070-4077.
- 15 9. Strappe PM, Hampton DW, Cachon-Gonzalez B, Fawcett JW, Lever A. Delivery of a lentiviral vector in a Pluronic F127 gel to cells of the central nervous system. *Eur J Pharm Biopharm* 2005;61:126-133.
10. Waehler R, Russell SJ, Curiel DT. Engineering targeted viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet* 2007;8:573-587.
- 20 11. Guibinga GH, Hall FL, Gordon EM, Ruoslahti E, Friedmann T. Ligand-modified vesicular stomatitis virus glycoprotein displays a temperature-sensitive intracellular trafficking and virus assembly phenotype. *Mol Ther* 2004;9(1):76-84.
- 25 12. Kameyama Y, Kawabe Y, Ito A, Kamihira M. Antibody-dependent gene transduction using gammaretroviral and lentiviral vectors pseudotyped with chimeric vesicular stomatitis virus glycoprotein. *J Virol Methods* 2008;153(1):49-54.
- 30 13. Padmashali RM, Andreadis ST. Engineering fibrinogen-binding VSV-G envelope for spatially- and cell-controlled lentivirus delivery through fibrin hydrogels. *Biomaterials* 2011;32(12):3330-3339.
14. Dreja H, Piechaczyk M. The effects of N-terminal insertion into VSV-G of an scFv peptide. *Virol J* 2006;3:69.
- 35 15. Guinivan P, Ladda RL. Decrease in epidermal growth factor receptor levels and production of material enhancing epidermal growth factor binding accompany the temperature-dependent changes from normal to transformed phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979;76(7):3377-3381.
16. Yewale C, Baradia D, Vhora I, Patil S, Misra A. Epidermal growth factor receptor targeting in cancer: a review of trends and strategies. *Biomaterials*. 2013;34(34):8690-8707.
- 40 17. Udayachander M, Meenakshi A, Ansamma J, Muthiah R. Lymphoma-associated antigen (LAA): isolation, characterization and clinical evaluation. *Br J Cancer*. 1983;48(5):717-725.
- 45 18. Deutsch YE, Tadmor T, Podack ER, Rosenblatt JD. CD30: an important new target in hematologic malignancies. *Leuk Lymphoma*. 2011;52(9):1641-1654.
19. Matthey B, Borchmann P, Schnell R, Tawadros S, Lange H, Huhn M *et al.* Metalloproteinase inhibition augments antitumor efficacy of the anti-CD30 immunotoxin Ki-3(scFv)-ETA' against human lymphomas in vivo. *Int J Cancer* 2004;111:568-574.
- 50 20. Braschoss S, Hirsch B, Duebel S, Stein H, Duerkop H. New anti-CD30 human pancreatic ribonuclease-based immunotoxin reveals strong and specific cytotoxicity in vivo. *Leuk Lymphoma* 2007;48:1179-1186.
- 55 21. Pardo A, Stoecker M, Kampmeier F, Melmer G, Fischer R, Thepen T *et al.* In vivo imaging of immunotoxin treatment using *Katushka*-transfected A-431 cells in a murine xenograft tumour model. *Cancer Immunol Immunother* 2012;61:1617-1626.
22. Ingrao D, Majdoul S, Seye AK, Galy A, Fenard D. Concurrent Measures of Fusion and Transduction Efficiency of Primary CD34+ Cells with Human Immunodeficiency Virus 1-Based Lentiviral Vectors Reveal Different Effects of Transduction Enhancers. *Hum Gene Ther Methods* 2013; In print.
- 60 23. Höfig I, Atkinson MJ, Mall S, Krackhardt AM, Thirion C, Anastasov N. Poloxamer Synperonic F108 improves cellular transduction with lentiviral vectors. *J Gene Med* 2012;14:549-560.
- 65 24. Anastasov N, Bonzheim I, Rudelius M, Klier M, Dau T, Angermeier D *et al.* C/EBP β expression in ALK-positive

- anaplastic large cell lymphomas is required for cell proliferation and is induced by the STAT3 signaling pathway. *Haematologica* 2010;95(5):760-767.
- 5 25. Funke S, Maisner A, Muehlebach MD, Koehl U, Grez M, Cattaneo R *et al.* Targeted cell entry of lentiviral vectors. *Mol Ther* 2008;16:1427-1436.
26. Cornetta K, Anderson WF. Protamine sulfate as an effective alternative to polybrene in retroviral-mediated genetransfer: implications for human gene therapy. *J Virol Methods* 1989;23:187-194.
- 10 27. Toyoshima K, Vogt PK. Enhancement and inhibition of avian sarcoma viruses by polycations and polyanions. *Virology* 1969;38:414-426.
28. Davis HE, Rosinski M, Morgan JR, Yarmush ML. Charged polymers modulate retrovirus transduction via membrane charge neutralization and virus aggregation. *Biophys J* 2004;86:1234-1242.
- 15 29. Hanenberg H, Xiao XL, Dilloo D, Hashino K, Kato I, Williams DA. Colocalization of retrovirus and target cells on specific fibronectin fragments increases genetic transduction of mammalian cells. *Nat Med* 1996;2:876-882.
30. Sandrin V, Bosen B, Salmon P, Gay W, Nègre D, Le Grand R *et al.* Lentiviral vectors pseudotyped with a modified RD114 envelope glycoprotein show increased stability in sera and augmented transduction of primary lymphocytes and CD34+ cells derived from human and nonhuman primates. *Blood* 2002;100:823-832.
- 20 31. Haas DL, Case SS, Crooks GM, Kohn DB. Critical factors influencing stable transduction of human CD34(+) cells with HIV-1-derived lentiviral vectors. *Mol Ther* 2000;2:71-80.
- 25 32. Fenard D, Ingrao D, Seye A, Buisset J, Genries S, Martin S *et al.* Vectofusin-1, a new viral entry enhancer, strongly promotes lentiviral transduction of human hematopoietic stem cells. *Mol Ther Nucleic Acids* 2013;2:e90.
33. Wu DT, Seita Y, Zhang X, Lu CW, Roth MJ. Antibody-directed lentiviral gene transduction for live-cell monitoring and selection of human iPS and hES cells. *PLoS One* 2012;7:e34778.
- 30 34. Zhang KX, Moussavi M, Kim C, Chow E, Chen IS, Fazli L *et al.* Lentiviruses with trastuzumab bound to their envelopes can target and kill prostate cancer cells. *Cancer Gene Ther* 2009;16:820-831.
- 35 35. Morizono K, Xie Y, Ringpis GE, Johnson M, Nassanian H, Lee B *et al.* Lentiviral vector retargeting to P-glycoprotein on metastatic melanoma through intravenous injection. *Nat Med* 2005;11:346-352.
36. Ayala-Breton C, Barber GN, Russell SJ, Peng KW. Retargeting vesicular stomatitis virus using measles virus envelope glycoproteins. *Hum Gene Ther* 2012;23:484-491.
- 40 37. Farley DC, Iqball S, Smith JC, Miskin JE, Kingsman SM, Mitrophanous KA. Factors that influence VSV-G pseudotyping and transduction efficiency of lentiviral vectors - in vitro and in vivo implications. *J Gene Med* 2007;9:345-356.
- 45 38. Schlehuber LD, Rose JK. Prediction and identification of a permissive epitope insertion site in the vesicular stomatitis virus glycoprotein. *J Virol* 2004;78(10):5079-5087.
39. Yu JH, Schaffer DV. Selection of novel vesicular stomatitis virus glycoprotein variants from a peptide insertion library for enhanced purification of retroviral and lentiviral vectors. *J Virol* 2006;80:3285-3292.
- 50 40. Kaikkonen MU, Lesch HP, Pikkarainen J, Raety JK, Vuorio T, Huhtala T *et al.* (Strept)avidin-displaying lentiviruses as versatile tools for targeting and dual imaging of gene delivery. *Gene Ther* 2009;16:894-904.
41. Jeong Lee H, Pardridge WM. Drug targeting to the brain using avidin-biotin technology in the mouse. *J Drug Target* 2000;8:413-424.
- 55 42. Roche S, Albertini AA, Lepault J, Bressanelli S, Gaudin Y. Estructuras of vesicular stomatitis virus glycoprotein: membrane fusion revisited. *Cell Mol Life Sci* 2008;65:1716-1728.
- 60 43. Albertini AA, Mérigoux C, Libersou S, Madiona K, Bressanelli S, Roche S *et al.* Characterization of monomeric intermediates during VSV glycoprotein structural transition. *PLoS Pathog* 2012;8(2):e1002556.
44. Millington M, Arndt A, Boyd M, Applegate T, Shen S, 2009 Towards a Clinically Relevant Lentiviral Transduction Protocol for Primary Human CD34+ Hematopoietic Stem/Progenitor Cells. *PLoS ONE* 4(7): e6461. doi:10.1371/journal.pone.0006461.
- 65

45. Lemberg y Martoglio. Requirements for signal peptide peptidase-catalyzed intramembrane proteolysis. *Mol Cell.* 2002;10(4):735-44.
46. Schwartz. Origins and evolution of cotranslational transport to the ER. *Adv Exp Med Biol.* 2007;607:52-60.
47. Yeagle "The Membranes of Cells", Academic Press, Ámsterdam (1993).
48. Luckey "Membrane Structural Biology: With Biochemical and Biophysical Foundations", Cambridge University Press, Cambridge (2008).
49. Yoneda J, Saiki I, Igarashi Y, Kobayashi H, Fujii H, Ishizaki Y, Kimizuka F, Kato I, Azuma I. Role of the heparinbinding domain of chimeric peptides derived from fibronectin in cell spreading and motility. *Exp Cell Res.* Marzo de 1995;217(1):169-79.
50. Michalsky, E., Goede, A. y Preissner, R. (2003) Loops In Proteins (LIP)-a comprehensive loop database for homology modelling. *Protein Eng.* 16, 979-985.
51. Novella. Contributions of vesicular stomatitis virus to the understanding of RNA virus evolution. *Curr Opin Microbiol.* 2003;6(4):399-405.
52. Lichty, Power, Stojdl y Bell. Vesicular stomatitis virus: re-inventing the bullet. *Trends Mol Med.* 2004;10(5):210-6.
53. Regan y Whittaker. Entry of rhabdoviruses into animal cells. *Adv Exp Med Biol.* 2013;790:167-77.
54. Martinez y Wertz. Biological differences between vesicular stomatitis virus Indiana and New Jersey serotype glycoproteins: identification of amino acid residues modulating pH-dependent infectivity. *J Virol.* 2005;79(6):3578-85.
55. Fredericksen y Whitt. Vesicular stomatitis virus glycoprotein mutations that affect membrane fusion activity and abolish virus infectivity. *J. Virol.* 1995;69:1435-43.
56. Schlehuber y Rose. Prediction and identification of a permissive epitope insertion site in the vesicular stomatitis virus glycoprotein. *J Virol.* 2004;78(10):5079-87.].
57. Yee JK, Friedmann T, Burns JC. Generation of high-titer pseudotyped retroviral vectors with very broad host range. *Methods Cell Biol.* 1994; 43 Pt A:99-112.
58. Cronin J, Zhang XY, Reiser J. Altering the tropism of lentiviral vectors through pseudotyping. *Curr Gene Ther.* Agosto de 2005;5(4):387-98.
59. Bartosch B, Cosset FL. Strategies for retargeted gene delivery using vectors derived from lentiviruses. *Curr Gene Ther.* Diciembre de 2004;4(4):427-43.
60. Froelich S, Tai A, Wang P. Lentiviral vectors for immune cells targeting. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* Junio de 2010;32(2):208-18.
61. Naldini, L. (1998) Lentiviruses as Gene Transfer Agents for Delivery to Non-dividing Cells. *Curr. Opin. Biotechnol.* 9, 457-463.
62. Robison C.L. y Whitt, M.A.: The Membrane-Proximal Stem Region of Vesicular Stomatitis Virus G Protein Confers Efficient Virus Assembly. *Journal of Virology*, Marzo de 2000, págs. 2239-2246.
63. Klimka *et al.* An anti-CD30 single-chain Fv selected by phage display and fused to Pseudomonas exotoxin A (Ki-4(scFv)-ETA') is a potent immunotoxin against a Hodgkin-derived cell line. *Br J Cancer.* Junio de 1999;80(8):1214-22.
64. Kettleborough CA, Ansell KH, Allen RW, Rosell-Vives E, Güssow DH, Bendig MM. Isolation of tumor cell-specific single-chain Fv from immunized mice using phage-antibody libraries and the re-construction of whole antibodies from these antibody fragments. *Eur J Immunol.* Abril de 1994;24(4):952-8.

60 **Lista de secuencias**

<110> SIRION BIOTECH GmbH Helmholtz Zentrum München

<120> Vectores lentivirales pseudotipados

<130> W1041 PCT

ES 2 761 638 T3

<150> EP14150846.5
<151> 10-01-2014

5 <160> 14
<170> BiSSAP 1.2

<210> 1
10 <211> 48
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
15 <221> fuente
<222> 1..48
<223> /tipo_mol="ADN sin asignar" /nota="secuencia señal de retículo endoplasmático (RE) de VSV-G"
/organismo="Secuencia artificial"

20 <400> 1
atgaagtgcc tttgtactt agcctttta tcattgggg tgaattgc 48

<210> 2
25 <211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
30 <223> Secuencia señal de retículo endoplasmático (RE) de VSV-G

<400> 2
Met Lys Cys Leu Leu Tyr Leu Ala Phe Leu Phe Ile Gly Val Asn Cys
1 5 10 15

35 <210> 3
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<221> fuente
<222> 1..39
<223> /tipo_mol="ADN sin asignar" /nota="Enlazador entre scFv y VSV-G" /organismo="Secuencia artificial"

45 <400> 3
ggaggcgggt caggaggtgg ctcgagcggga ggcggttca 39

50 <210> 4
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Enlazador entre scFv y VSV-G

<400> 4
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 5
<211> 1488

ES 2 761 638 T3

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

5 <221> fuente
<222> 1..1488

<223> /tipo_mol="ADN sin asignar" /nota="VSV-G sin secuencia señal" /organismo="Secuencia artificial"

<400> 5

10

```

aagttcacca tagtttttcc acacaaccaa aaaggaaact ggaaaaatgt tccttctaataat      60
taccattatt gcccgtaag ctcagattta aattggcata atgacttaataat aggcacagccc      120
atacaagtca aaatgcccaa gagtcacaag gctattcaag cagacgggttg gatgtgtcat      180
gcttccaaat gggtcactac ttgtgatttc cgctgggatg gaccgaagta tataacacag      240
tccatccgat ccttcaactc atctgtagaa caatgcaagg aaagcattga acaaacgaaa      300
caaggaactt ggctgaatcc aggcctccct cctcaaagtt gtggatatgc aactgtgacg      360
gatgccgaag cagtgattgt ccagggtgact cctcacatg tgctgggtga tgaatacaca      420
ggagaatggg ttgattcaca gttcatcaac ggaaaaatgca gcaattacat atgccccact      480
gtccataact ctacaacctg gcattctgac tataaggtca aagggtatg tgattctaac      540
ctcatttcca tggacatcac cttcttctca gaggacggag agctatcatc cctgggaaag      600
gagggcacag gggtcagaag taactacttt gcttatgaaa ctggaggcaa ggcctgcaaa      660
atgcaatact gcaagcattg gggagtcaga ctcccatcag gtgtctgggtt cgagatggct      720
gataaggatc tctttgctgc agccagattc cctgaatgcc cagaagggtc aagtatctct      780
gctccatctc agacctcagt ggatgtaagt ctaattcagg acgttgagag gatcttggat      840
tattccctct gccaaagaaac ctggagcaaa atcagagcgg gtcttccaat ctctccagtg      900
gatctcagct atcttgctcc taaaaacca ggaaccggtc ctgctttcac cataatcaat      960
ggtaaccctaa aatactttga gaccagatac atcagagtcg atattgctgc tccaatcctc     1020
tcaagaatgg tcggaatgat cagtggaaact accacagaaa gggaaactgtg ggatgactgg     1080
gcaccatatg aagacgtgga aattggacct aatggagttc tgaggaccag ttcaggatat     1140
aagtttcctt tatacatgat tggacatggt atgttgact ccgatcttca tcttagctca     1200
aaggctcagg tgttcgaaca tcctcacatt caagacgctg cttcgcaact tcctgatgat     1260
gagagtttat tttttggtga tactgggcta tccaaaaatc caatcgagct tgtagaaggt     1320
tggttcagta gttggaaaag ctctattgcc tcttttttct ttatcatagg gttaatcatt     1380
ggactattct tggttctccg agttggtatc catctttgca ttaaattaa gcacaccaag     1440
aaaagacaga tttatacaga catagagatg aaccgacttg gaaagtaa     1488

```

<210> 6

15 <211> 495

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 761 638 T3

<220>

<223> VSV-G sin secuencia señal

5 <400> 6

Lys Phe Thr Ile Val Phe Pro His Asn Gln Lys Gly Asn Trp Lys Asn
1 5 10 15
Val Pro Ser Asn Tyr His Tyr Cys Pro Ser Ser Ser Asp Leu Asn Trp
20 25 30
His Asn Asp Leu Ile Gly Thr Ala Ile Gln Val Lys Met Pro Lys Ser
35 40 45
His Lys Ala Ile Gln Ala Asp Gly Trp Met Cys His Ala Ser Lys Trp
50 55 60
Val Thr Thr Cys Asp Phe Arg Trp Tyr Gly Pro Lys Tyr Ile Thr Gln
65 70 75 80
Ser Ile Arg Ser Phe Thr Pro Ser Val Glu Gln Cys Lys Glu Ser Ile
85 90 95
Glu Gln Thr Lys Gln Gly Thr Trp Leu Asn Pro Gly Phe Pro Pro Gln
100 105 110
Ser Cys Gly Tyr Ala Thr Val Thr Asp Ala Glu Ala Val Ile Val Gln
115 120 125
Val Thr Pro His His Val Leu Val Asp Glu Tyr Thr Gly Glu Trp Val
130 135 140
Asp Ser Gln Phe Ile Asn Gly Lys Cys Ser Asn Tyr Ile Cys Pro Thr
145 150 155 160
Val His Asn Ser Thr Thr Trp His Ser Asp Tyr Lys Val Lys Gly Leu
165 170 175
Cys Asp Ser Asn Leu Ile Ser Met Asp Ile Thr Phe Phe Ser Glu Asp
180 185 190
Gly Glu Leu Ser Ser Leu Gly Lys Glu Gly Thr Gly Phe Arg Ser Asn
195 200 205
Tyr Phe Ala Tyr Glu Thr Gly Gly Lys Ala Cys Lys Met Gln Tyr Cys
210 215 220
Lys His Trp Gly Val Arg Leu Pro Ser Gly Val Trp Phe Glu Met Ala
225 230 235 240
Asp Lys Asp Leu Phe Ala Ala Ala Arg Phe Pro Glu Cys Pro Glu Gly
245 250 255
Ser Ser Ile Ser Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Asp Val Ser Leu Ile
260 265 270
Gln Asp Val Glu Arg Ile Leu Asp Tyr Ser Leu Cys Gln Glu Thr Trp
275 280 285
Ser Lys Ile Arg Ala Gly Leu Pro Ile Ser Pro Val Asp Leu Ser Tyr
290 295 300
Leu Ala Pro Lys Asn Pro Gly Thr Gly Pro Ala Phe Thr Ile Ile Asn
305 310 315 320
Gly Thr Leu Lys Tyr Phe Glu Thr Arg Tyr Ile Arg Val Asp Ile Ala
325 330 335

ES 2 761 638 T3

Ala Pro Ile Leu Ser Arg Met Val Gly Met Ile Ser Gly Thr Thr Thr
 340 345 350
 Glu Arg Glu Leu Trp Asp Asp Trp Ala Pro Tyr Glu Asp Val Glu Ile
 355 360 365
 Gly Pro Asn Gly Val Leu Arg Thr Ser Ser Gly Tyr Lys Phe Pro Leu
 370 375 380
 Tyr Met Ile Gly His Gly Met Leu Asp Ser Asp Leu His Leu Ser Ser
 385 390 395 400
 Lys Ala Gln Val Phe Glu His Pro His Ile Gln Asp Ala Ala Ser Gln
 405 410 415
 Leu Pro Asp Asp Glu Ser Leu Phe Phe Gly Asp Thr Gly Leu Ser Lys
 420 425 430
 Asn Pro Ile Glu Leu Val Glu Gly Trp Phe Ser Ser Trp Lys Ser Ser
 435 440 445
 Ile Ala Ser Phe Phe Phe Ile Ile Gly Leu Ile Ile Gly Leu Phe Leu
 450 455 460
 Val Leu Arg Val Gly Ile His Leu Cys Ile Lys Leu Lys His Thr Lys
 465 470 475 480
 Lys Arg Gln Ile Tyr Thr Asp Ile Glu Met Asn Arg Leu Gly Lys
 485 490 495

<210> 7
 <211> 2325
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 10 <222> 1..2325
 <223> /tipo_mol="ADN sin asignar" /nota="scFvCD30-VSV-G (secuencia señal de VSV-G - etiqueta His - scFvCD30 - enlazador - VSV-G)" /organismo="Secuencia artificial"

<400> 7

15 atgaagtgcc ttttgtactt agccttttta ttcattgggg tcaattgcca tcatcatcat 60
 catcatgccc aggtcaagct gcaggagtca gggactgaac tggcaaagcc tggggccgca 120
 gtgaagatgt cctgcaaggc ttctggctac acctttactg actactggat gcaactgggtt 180
 aaacagaggc ctggacaggg tctggaatgg attggataca ttaatcctaa cactgcttat 240
 actgactaca atcagaaatt caaggacaag gccacattga ctgcagacaa atcctccagc 300
 acagcctaca tgcaactgcg cagcctgacc tctgaggatt ctgcagtcta ttactgtgca 360
 aaaaagacaa ctcagactac gtggggggtt cctttttggg gccaaaggac cacggtcacc 420
 gtctcctcag gtggaggcgg ttcaggcggg ggtggctctg gcggtggcgg atcggacatt 480
 gtgctgaccc agtctccaaa atccatggcc atgtcagtcg gagagagggt caccttgagc 540
 tgcaaggcca gtgagaatgt ggattctttt gtttcctggt atcaacagaa accaggccag 600
 tctcctaaac tgctgatata cggggcctcc aaccggtaca ctgggggtccc cgatcgcttc 660
 gcaggcagtg gatctggaag agatttcact ctgacatca gcagtgtgca ggctgaagac 720
 cttgcagatt atcactgtgg acagaattac aggtatccgc tcacgttcgg tgctggcacc 780
 aagctggaaa tcaaacgggg aggcggttca ggaggtggct cgagcggagg cggttcaaag 840

ES 2 761 638 T3

ttcaccatag tttttccaca caaccaaaaa ggaaactgga aaaatgttcc ttctaattac 900
cattattgcc cgtcaagctc agattttaat tggcataatg acttaatagg cacagccata 960
caagtcaaaa tgcccaagag tcacaaggct attcaagcag acggttgat gtgtcatgct 1020
tccaaatggg tcaactactg tgatttccgc tggatggac cgaagtatat aacacagtcc 1080
atccgatcct tcaactccatc tgtagaaca tgcaaggaaa gcattgaaca aacgaaaca 1140
ggaacttggc tgaatccagg cttccctcct caaagttgtg gatatgcaac tgtgacggat 1200
gccgaagcag tgattgtcca ggtgactcct caccatgtgc tggttgatga atacacagga 1260
gaatgggttg attcacagt catcaacgga aatgcagca attacatat ccccactgtc 1320
cataactcta caacctggca ttctgactat aaggtcaaag ggctatgtga ttctaacctc 1380
atttccatgg acatcacctt cttctcagag gacggagagc tatcatccct gggaaaggag 1440
ggcacagggg tcagaagtaa ctactttgct tatgaaactg gaggcaaggc ctgcaaaatg 1500
caatactgca agcattgggg agtcagactc ccatcaggtg tctggttcga gatggctgat 1560
aaggatctct ttgctgcagc cagattccct gaatgccag aagggtcaag tatctctgct 1620
ccatctcaga cctcagtggg tgtaagtcta attcaggacg ttgagaggat cttggattat 1680
tccctctgcc aagaaacctg gagcaaaatc agagcgggtc ttccaatctc tccagtggat 1740
ctcagctatc ttgctcctaa aaaccagga accggtcctg ctttaccat aatcaatggg 1800
accctaaaat actttgagac cagatacatc agagtcgata ttgctgctcc aatcctctca 1860
agaatggtcg gaatgatcag tggaactacc acagaaaggg aactgtggga tgactgggca 1920
ccatatgaag acgtggaaat tggaccaat ggagttctga ggaccagttc aggatataag 1980
tttcctttat acatgattgg acatggtatg ttggactccg atcttcatct tagctcaaag 2040
gctcaggtgt tcgaacatcc tcacattcaa gacgctgctt cgcaacttcc tgatgatgag 2100
agtttatttt ttggtgatac tgggctatcc aaaaatcaa tcgagcttgt agaaggttgg 2160
ttcagtagtt ggaaaagctc tattgcctct ttttcttta tcataggggt aatcattgga 2220
ctattcttgg ttctccgagt tggatccat ctttgcatta aattaaagca caccaagaaa 2280
agacagattt atacagacat agagatgaac cgacttgga agtaa 2325

<210> 8

<211> 774

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> scFvCD30-VSV-G (secuencia señal de VSV-G - etiqueta His - scFvCD30 - enlazador - VSV-G)

<400> 8

Met Lys Cys Leu Leu Tyr Leu Ala Phe Leu Phe Ile Gly Val Asn Cys

1

5

10

15

ES 2 761 638 T3

His His His His His His Ala Gln Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Thr
 20 25 30
 Glu Leu Ala Lys Pro Gly Ala Ala Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser
 35 40 45
 Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro
 50 55 60
 Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Thr Asp Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp
 85 90 95
 Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu
 100 105 110
 Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Lys Thr Thr Gln Thr Thr Trp
 115 120 125
 Gly Phe Pro Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly
 130 135 140
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile
 145 150 155 160
 Val Leu Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ala Met Ser Val Gly Glu Arg
 165 170 175
 Val Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Glu Asn Val Asp Ser Phe Val Ser
 180 185 190
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly
 195 200 205
 Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ala Gly Ser Gly
 210 215 220
 Ser Gly Arg Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp
 225 230 235 240
 Leu Ala Asp Tyr His Cys Gly Gln Asn Tyr Arg Tyr Pro Leu Thr Phe
 245 250 255
 Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 260 265 270
 Gly Ser Ser Gly Gly Gly Ser Lys Phe Thr Ile Val Phe Pro His Asn
 275 280 285
 Gln Lys Gly Asn Trp Lys Asn Val Pro Ser Asn Tyr His Tyr Cys Pro
 290 295 300
 Ser Ser Ser Asp Leu Asn Trp His Asn Asp Leu Ile Gly Thr Ala Ile
 305 310 315 320
 Gln Val Lys Met Pro Lys Ser His Lys Ala Ile Gln Ala Asp Gly Trp
 325 330 335
 Met Cys His Ala Ser Lys Trp Val Thr Thr Cys Asp Phe Arg Trp Tyr
 340 345 350
 Gly Pro Lys Tyr Ile Thr Gln Ser Ile Arg Ser Phe Thr Pro Ser Val
 355 360 365
 Glu Gln Cys Lys Glu Ser Ile Glu Gln Thr Lys Gln Gly Thr Trp Leu
 370 375 380
 Asn Pro Gly Phe Pro Pro Gln Ser Cys Gly Tyr Ala Thr Val Thr Asp
 385 390 395 400
 Ala Glu Ala Val Ile Val Gln Val Thr Pro His His Val Leu Val Asp
 405 410 415
 Glu Tyr Thr Gly Glu Trp Val Asp Ser Gln Phe Ile Asn Gly Lys Cys
 420 425 430
 Ser Asn Tyr Ile Cys Pro Thr Val His Asn Ser Thr Thr Trp His Ser
 435 440 445
 Asp Tyr Lys Val Lys Gly Leu Cys Asp Ser Asn Leu Ile Ser Met Asp
 450 455 460
 Ile Thr Phe Phe Ser Glu Asp Gly Glu Leu Ser Ser Leu Gly Lys Glu
 465 470 475 480
 Gly Thr Gly Phe Arg Ser Asn Tyr Phe Ala Tyr Glu Thr Gly Gly Lys
 485 490 495
 Ala Cys Lys Met Gln Tyr Cys Lys His Trp Gly Val Arg Leu Pro Ser
 500 505 510
 Gly Val Trp Phe Glu Met Ala Asp Lys Asp Leu Phe Ala Ala Arg

ES 2 761 638 T3

	515					520						525			
Phe	Pro	Glu	Cys	Pro	Glu	Gly	Ser	Ser	Ile	Ser	Ala	Pro	Ser	Gln	Thr
	530					535					540				
Ser	Val	Asp	Val	Ser	Leu	Ile	Gln	Asp	Val	Glu	Arg	Ile	Leu	Asp	Tyr
545					550					555					560
Ser	Leu	Cys	Gln	Glu	Thr	Trp	Ser	Lys	Ile	Arg	Ala	Gly	Leu	Pro	Ile
				565					570						575
Ser	Pro	Val	Asp	Leu	Ser	Tyr	Leu	Ala	Pro	Lys	Asn	Pro	Gly	Thr	Gly
			580					585					590		
Pro	Ala	Phe	Thr	Ile	Ile	Asn	Gly	Thr	Leu	Lys	Tyr	Phe	Glu	Thr	Arg
		595					600						605		
Tyr	Ile	Arg	Val	Asp	Ile	Ala	Ala	Pro	Ile	Leu	Ser	Arg	Met	Val	Gly
	610					615						620			
Met	Ile	Ser	Gly	Thr	Thr	Thr	Glu	Arg	Glu	Leu	Trp	Asp	Asp	Trp	Ala
625					630					635					640
Pro	Tyr	Glu	Asp	Val	Glu	Ile	Gly	Pro	Asn	Gly	Val	Leu	Arg	Thr	Ser
				645					650						655
Ser	Gly	Tyr	Lys	Phe	Pro	Leu	Tyr	Met	Ile	Gly	His	Gly	Met	Leu	Asp
			660					665					670		
Ser	Asp	Leu	His	Leu	Ser	Ser	Lys	Ala	Gln	Val	Phe	Glu	His	Pro	His
		675					680					685			
Ile	Gln	Asp	Ala	Ala	Ser	Gln	Leu	Pro	Asp	Asp	Glu	Ser	Leu	Phe	Phe
	690					695					700				
Gly	Asp	Thr	Gly	Leu	Ser	Lys	Asn	Pro	Ile	Glu	Leu	Val	Glu	Gly	Trp
705					710					715					720
Phe	Ser	Ser	Trp	Lys	Ser	Ser	Ile	Ala	Ser	Phe	Phe	Phe	Ile	Ile	Gly
			725					730							735
Leu	Ile	Ile	Gly	Leu	Phe	Leu	Val	Leu	Arg	Val	Gly	Ile	His	Leu	Cys
			740					745					750		
Ile	Lys	Leu	Lys	His	Thr	Lys	Lys	Arg	Gln	Ile	Tyr	Thr	Asp	Ile	Glu
	755						760						765		
Met	Asn	Arg	Leu	Gly	Lys										
	770														

<210> 9
 <211> 2344
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 10 <222> 1..2344
 <223> /tipo_mol="ADN sin asignar" /nota="scFvEGFR-VSV-G (secuencia señal de VSV-G - etiqueta His - scFvEGFR - enlazador - VSV-G)" /organismo="Secuencia artificial"

<400> 9

15	atgaagtgcc	ttttgtactt	agccttttta	ttcattgggg	tcaattgcca	tcatcatcat	60
	catcatgccg	aggtgcaact	gcagcagtct	ggggctgaac	tggtgaagcc	tggggcttca	120
	gtgaagttgt	cctgcaaggc	ttccggctac	acctcacca	gccactggat	gcactgggtg	180
	aagcagaggg	ctggacaagg	ccttgagtgg	atcggagagt	ttaatcccag	caacggccgt	240
	actaactaca	atgagaaatt	caagagcaag	gccacactga	ctgtagacaa	atcctccagc	300
	acagcctaca	tgcaactcag	cagcctgaca	tctgaggact	ctgcggtcta	ttactgtgcc	360
	agtcgggact	atgattacga	cggacggtac	tttgactact	ggggccaagg	gaccacggtc	420
	accgtctcct	caggtggcgg	tggctcgggc	ggtggtgggt	cgggtggtgg	cggatctgac	480

ES 2 761 638 T3

atcgagctca cccagtctcc agcaatcatg tctgcatctc caggggagaa ggtcactatg 540
 acctgcagtg ccagctcaag tgtaacttac atgtattggt accagcagaa gccaggatcc 600
 tccccagac tcttgattta tgacacatcc aacctggctt ctggagtccc tgttcgtttc 660
 agtggcagtg ggtctgggac ctcttactct ctcaaatca gccgaatgga ggctgaagat 720
 gctgccactt attactgcca gcagtggagt agtcacatat tcacgttcgg ctcggggaca 780
 gaactcgaga tcaaacgggt cgagcggagg cggttcagga ggcggttcag gaggtggctc 840
 gagcggaggc ggttcaaagt tcacatagat ttttccacac aacccaaaag gaaactggaa 900
 aatgttcct tctaattacc attattgccc gtcaagctca gatttaaatt ggcataatga 960
 cttaataggc acagccatac aagtcaaaat gcccaagagt cacaaggcta ttcaagcaga 1020
 cggttggatg tgtcatgctt ccaaagggt cactacttgt gatttccgct ggtatggacc 1080
 gaagtatata acacagtcca tccgatcctt cactccatct gtagaacaat gcaaggaaag 1140
 cattgaacaa acgaaacaag gaacttggct gaatccaggc ttccctctc aaagttgtgg 1200
 atatgcaact gtgacggatg ccgaagcagt gattgtccag gtgactctc accatgtgct 1260
 ggttgatgaa tacacaggag aatgggttga ttcacagttc atcaacggaa aatgcagcaa 1320
 ttacatatgc cccactgtcc ataactctac aacctggcat tctgactata aggtcaaagg 1380
 gctatgtgat tctaacctca tttccatgga catcaccttc ttctcagagg acggagagct 1440
 atcatccctg ggaaaggagg gcacagggtt cagaagtaac tactttgctt atgaaactgg 1500
 aggcaaggcc tgcaaaatgc aatactgcaa gcattgggga gtcagactcc catcaggtgt 1560
 ctggttcgag atggctgata aggatctctt tgctgcagcc agattccctg aatgcccaga 1620
 aggtcaagt atctctgctc catctcagac ctcagtggat gtaagtctaa ttcaggacgt 1680
 tgagaggatc ttggattatt ccctctgcca agaaacctgg agcaaaatca gagcgggtct 1740
 tccaatctct ccagtggatc tcagctatct tgctoctaaa aaccaggaa ccggtcctgc 1800
 tttcaccata atcaatggta ccctaaaata ctttgagacc agatacatca gagtcgatat 1860
 tgctgctcca atcctctcaa gaatggtcgg aatgatcagt ggaactacca cagaaagggga 1920
 actgtgggat gactgggcac catatgaaga cgtggaaatt ggacccaatg gagttctgag 1980
 gaccagttca ggatataagt ttctttata catgattgga catggtatgt tggactccga 2040
 tcttcatctt agctcaaagg ctcaagtggt cgaacatcct cacattcaag acgctgcttc 2100
 gcaacttct gatgatgaga gtttattttt tggtgatact gggctatcca aaaatccaat 2160
 cgagcttgta gaaggttggg tcagtagttg gaaaagctct attgcctctt ttttctttat 2220
 catagggtta atcattggac tattcttggg tctccaggtt ggtatccatc tttgcattaa 2280
 attaaagcac accaagaaaa gacagattta tacagacata gagatgaacc gacttggaaa 2340
 gtaa 2344

ES 2 761 638 T3

<210> 10
 <211> 780
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> scFvEGFR-VSV-G (secuencia señal de VSV-G - etiqueta His - scFvEGFR - enlazador - VSV-G)

<400> 10

10

```

Met Lys Cys Leu Leu Tyr Leu Ala Phe Leu Phe Ile Gly Val Asn Cys
1          5          10          15
His His His His His His Ala Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala
20          25          30
Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser
35          40          45
Gly Tyr Thr Phe Thr Ser His Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Ala
50          55          60
Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Glu Phe Asn Pro Ser Asn Gly Arg
65          70          75          80
Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp
85          90          95
Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu
100         105         110
Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser Arg Asp Tyr Asp Tyr Asp Gly
115         120         125
Arg Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
130         135         140
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp
145         150         155         160
Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu
165         170         175         180
Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Thr Tyr Met Tyr
180         185         190
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp
195         200         205
Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly
210         215         220
Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp
225         230         235         240
Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser His Ile Phe Thr Phe
245         250         255
Gly Ser Gly Thr Glu Leu Glu Ile Lys Arg Val Glu Arg Arg Arg Phe
260         265         270
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ser Gly Gly Gly Ser Lys Phe Thr
275         280         285
Ile Val Phe Pro His Asn Gln Lys Gly Asn Trp Lys Asn Val Pro Ser
290         295         300
Asn Tyr His Tyr Cys Pro Ser Ser Ser Asp Leu Asn Trp His Asn Asp
305         310         315         320
Leu Ile Gly Thr Ala Ile Gln Val Lys Met Pro Lys Ser His Lys Ala
325         330         335
Ile Gln Ala Asp Gly Trp Met Cys His Ala Ser Lys Trp Val Thr Thr
340         345         350
Cys Asp Phe Arg Trp Tyr Gly Pro Lys Tyr Ile Thr Gln Ser Ile Arg
355         360         365
Ser Phe Thr Pro Ser Val Glu Gln Cys Lys Glu Ser Ile Glu Gln Thr
370         375         380
Lys Gln Gly Thr Trp Leu Asn Pro Gly Phe Pro Pro Gln Ser Cys Gly
385         390         395         400
    
```

ES 2 761 638 T3

Tyr Ala Thr Val Thr Asp Ala Glu Ala Val Ile Val Gln Val Thr Pro
 405 410 415
 His His Val Leu Val Asp Glu Tyr Thr Gly Glu Trp Val Asp Ser Gln
 420 425 430
 Phe Ile Asn Gly Lys Cys Ser Asn Tyr Ile Cys Pro Thr Val His Asn
 435 440 445
 Ser Thr Thr Trp His Ser Asp Tyr Lys Val Lys Gly Leu Cys Asp Ser
 450 455 460
 Asn Leu Ile Ser Met Asp Ile Thr Phe Phe Ser Glu Asp Gly Glu Leu
 465 470 475 480
 Ser Ser Leu Gly Lys Glu Gly Thr Gly Phe Arg Ser Asn Tyr Phe Ala
 485 490 495
 Tyr Glu Thr Gly Gly Lys Ala Cys Lys Met Gln Tyr Cys Lys His Trp
 500 505 510
 Gly Val Arg Leu Pro Ser Gly Val Trp Phe Glu Met Ala Asp Lys Asp
 515 520 525
 Leu Phe Ala Ala Ala Arg Phe Pro Glu Cys Pro Glu Gly Ser Ser Ile
 530 535 540
 Ser Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Asp Val Ser Leu Ile Gln Asp Val
 545 550 555 560
 Glu Arg Ile Leu Asp Tyr Ser Leu Cys Gln Glu Thr Trp Ser Lys Ile
 565 570 575
 Arg Ala Gly Leu Pro Ile Ser Pro Val Asp Leu Ser Tyr Leu Ala Pro
 580 585 590
 Lys Asn Pro Gly Thr Gly Pro Ala Phe Thr Ile Ile Asn Gly Thr Leu
 595 600 605
 Lys Tyr Phe Glu Thr Arg Tyr Ile Arg Val Asp Ile Ala Ala Pro Ile
 610 615 620
 Leu Ser Arg Met Val Gly Met Ile Ser Gly Thr Thr Thr Glu Arg Glu
 625 630 635 640
 Leu Trp Asp Asp Trp Ala Pro Tyr Glu Asp Val Glu Ile Gly Pro Asn
 645 650 655
 Gly Val Leu Arg Thr Ser Ser Gly Tyr Lys Phe Pro Leu Tyr Met Ile
 660 665 670
 Gly His Gly Met Leu Asp Ser Asp Leu His Leu Ser Ser Lys Ala Gln
 675 680 685
 Val Phe Glu His Pro His Ile Gln Asp Ala Ala Ser Gln Leu Pro Asp
 690 695 700
 Asp Glu Ser Leu Phe Phe Gly Asp Thr Gly Leu Ser Lys Asn Pro Ile
 705 710 715 720
 Glu Leu Val Glu Gly Trp Phe Ser Ser Trp Lys Ser Ser Ile Ala Ser
 725 730 735
 Phe Phe Phe Ile Ile Gly Leu Ile Ile Gly Leu Phe Leu Val Leu Arg
 740 745 750
 Val Gly Ile His Leu Cys Ile Lys Leu Lys His Thr Lys Lys Arg Gln
 755 760 765
 Ile Tyr Thr Asp Ile Glu Met Asn Arg Leu Gly Lys
 770 775 780

<210> 11

<211> 69

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <222> 1..69

<223> /tipo_mol="ADN sin asignar" /nota="Mfel-cebador directo con etiqueta His" /organismo="Secuencia artificial"

<400> 11

15 gcgaccaatt gccatcatca tcatcatcat gcccaggtca agctgcagga gtggactgaa
 ctggcaaaag

60

69

ES 2 761 638 T3

<210> 12
 <211> 70
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..70
 10 <223> /tipo_mol="ADN sin asignar" /nota="cebador inverso, incluyendo la mitad de una secuencia enlazadora y que alberga un sitio Xho" /organismo="Secuencia artificial"

 <400> 12

 gtaatctcga gccacctcct gaaccgcctc cccgtttgat ttccagcttg gtgccacacc 60

 15 gaacgtggcg 70

 <210> 13
 <211> 62
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..62
 25 <223> /tipo_mol="ADN sin asignar" /nota="cebador directo, incluyendo la mitad de una secuencia enlazadora" /organismo="Secuencia artificial"

 <400> 13

 gttatctcga gcggaggcgg ttcaaagttc accatagttt ttccacacaa caaaagaaac 60

 30 tg 62

 <210> 14
 <211> 49
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente <222> 1..49
 <223> /tipo_mol="ADN sin asignar" /nota="cebador inverso" /organismo="Secuencia artificial"
 40

 <400> 14

 gtattaccgg ttctgggtt ttaggagca agatagctga gatccactg 49

REIVINDICACIONES

1. Partícula de vector lentiviral pseudotipada con
- 5 (a) una proteína de fusión de glicoproteína de la envuelta del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G) ligada a un dominio de unión a la membrana celular, estando dicha proteína de fusión codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende o que consiste en, en el sentido de 5' a 3',
- 10 (i) un primer segmento de secuencia que codifica para una secuencia señal de retículo endoplasmático (RE);
- (ii) un segundo segmento de secuencia que codifica para un (poli) péptido que comprende o que consiste en un dominio de unión a la membrana celular que puede unirse directamente a una membrana celular, conectando de ese modo una partícula viral que expresa la proteína de fusión a una célula diana que va a transducirse por la partícula viral;
- 15 (iii) un tercer segmento de secuencia que codifica para un enlazador (poli)peptídico flexible de al menos 3 aminoácidos de longitud; y
- 20 (iv) un cuarto segmento de secuencia que codifica para dicha VSV-G; y
- (b) una VSV-G nativa;
- 25 en la que la razón de la proteína de fusión de VSV-G de (a) con respecto a la VSV-G nativa de (b) está en el intervalo de aproximadamente el 10%: aproximadamente el 90% a aproximadamente el 50% : aproximadamente el 50%, en la que el término "aproximadamente" es una desviación con respecto a estos porcentajes de hasta el 5%.
- 30 2. Partícula de vector lentiviral según la reivindicación 1, en la que dicho (poli) péptido que comprende o que consiste en un dominio de unión a la membrana celular codificado por dicho segundo segmento de secuencia se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo de cadena sencilla, un anticuerpo con un solo dominio, un fragmento de anticuerpo V_HH, un anticuerpo de cadena sencilla VNAR y un andamiaje proteico.
- 35 3. Partícula de vector lentiviral según la reivindicación 1 ó 2, en la que el (poli) péptido que comprende o que consiste en un dominio de unión a la membrana celular se une específicamente a uno o más constituyentes de la membrana celular seleccionados del grupo que consiste en glicolípidos, fosfolípidos, oligosacáridos, receptores celulares acoplados a proteínas G (GPCR), proteínas de superficie celular de agrupación de diferenciación (CD), receptores de superficie celular, proteínas y correceptores de superficie celular.
- 40 4. Partícula de vector lentiviral según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que
- (a) dicho primer segmento de secuencia que codifica para dicha secuencia señal de RE comprende o consiste en la secuencia de ácido nucleico tal como se muestra en SEQ ID NO: 1;
- 45 (b) dicho tercer segmento de secuencia que codifica para un enlazador comprende o consiste en la secuencia de ácido nucleico tal como se muestra en SEQ ID NO: 3; y/o
- (c) dicho cuarto segmento de secuencia que codifica para dicha VSV-G comprende o consiste en la secuencia de ácido nucleico tal como se muestra en SEQ ID NO: 5.
- 50 5. Método de producción de la partícula de vector lentiviral pseudotipada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, comprendiendo el método transfectar en una célula hospedadora
- 55 (i) uno o más plásmidos de empaquetamiento que codifican para las proteínas de virión;
- (ii) un vector que comprende la molécula de ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4; y
- 60 (iii) un vector que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica para una VSV-G nativa.
6. Método para transducir células, *in vitro* o *ex vivo*, comprendiendo el método la etapa de:
- 65 poner en contacto células que van a transducirse con la partícula de vector lentiviral pseudotipada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en condiciones adecuadas para la transducción, transduciéndose de ese modo dichas células.

7. Método según la reivindicación 6, que comprende además poner en contacto las células con un adyuvante, preferiblemente un poloxámero que tiene un peso molecular de 12,8 kDa a aproximadamente 15 kDa.
- 5 8. Método según la reivindicación 7, que comprende además una etapa de someter a espinulación la partícula de vector lentiviral pseudotipada con las células antes de, de manera concomitante a o después de poner en contacto dichas células diana con dicho adyuvante.
- 10 9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que las células que van a transducirse se seleccionan del grupo que consiste en células tumorales, células de linaje linfóide, células epiteliales, células neuronales y células madre y/o, preferiblemente, en el que las células que van a transducirse forman parte de una población celular heteróloga.
- 15 10. Kit que comprende:
- (a) una molécula de ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, y una molécula de ácido nucleico que comprende o que consiste en una secuencia de ácido nucleico que codifica para una VSV-G nativa, en la que la razón de la molécula de ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 con respecto a la molécula de ácido nucleico que comprende o que consiste en una secuencia de ácido nucleico que codifica para una VSV-G nativa está en el intervalo de aproximadamente el 10% : aproximadamente el 90% a aproximadamente el 50% : aproximadamente el 50%, en la que el término "aproximadamente" es una desviación con respecto a estos porcentajes de hasta el 5%; y/o
- 20
- (b) una partícula de vector lentiviral pseudotipada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4;
- 25 y, opcionalmente, instrucciones de uso.

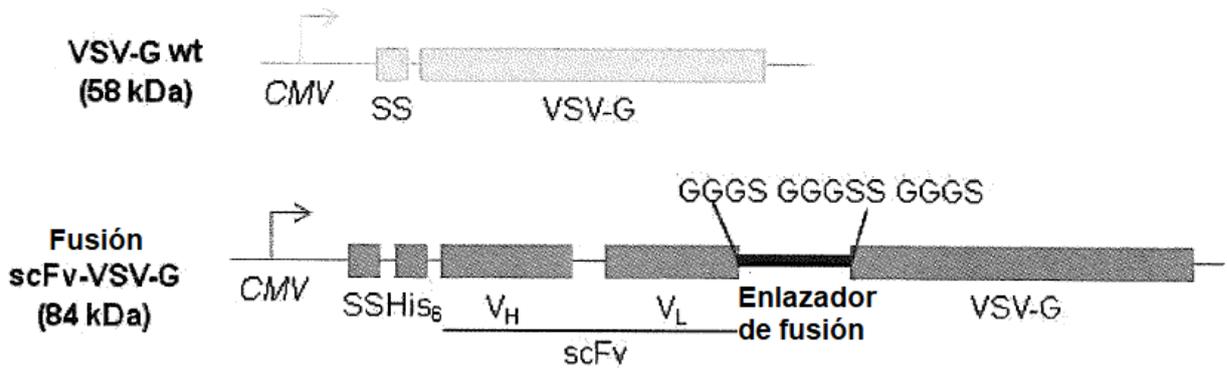


Figura 1

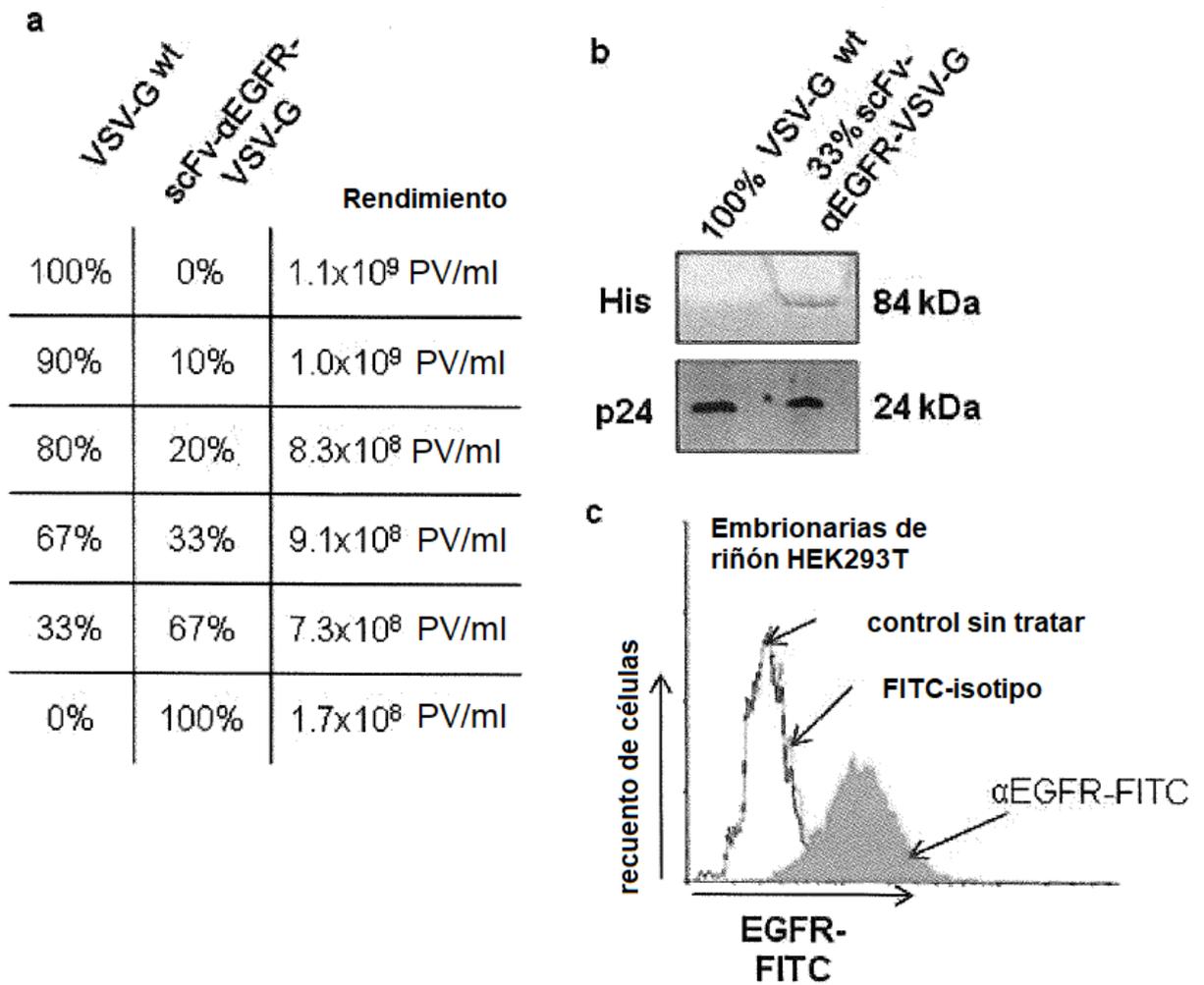


Figura 2

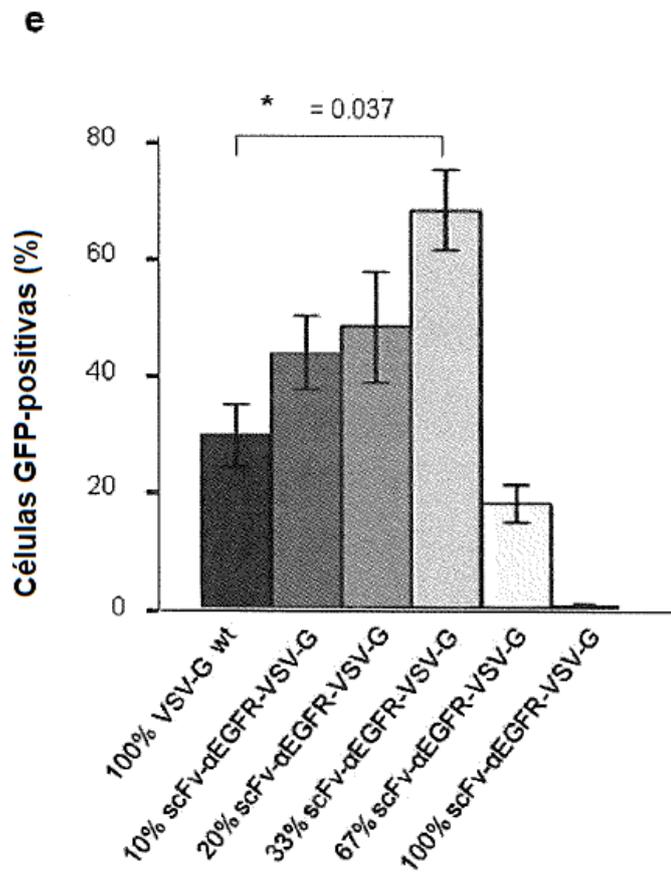
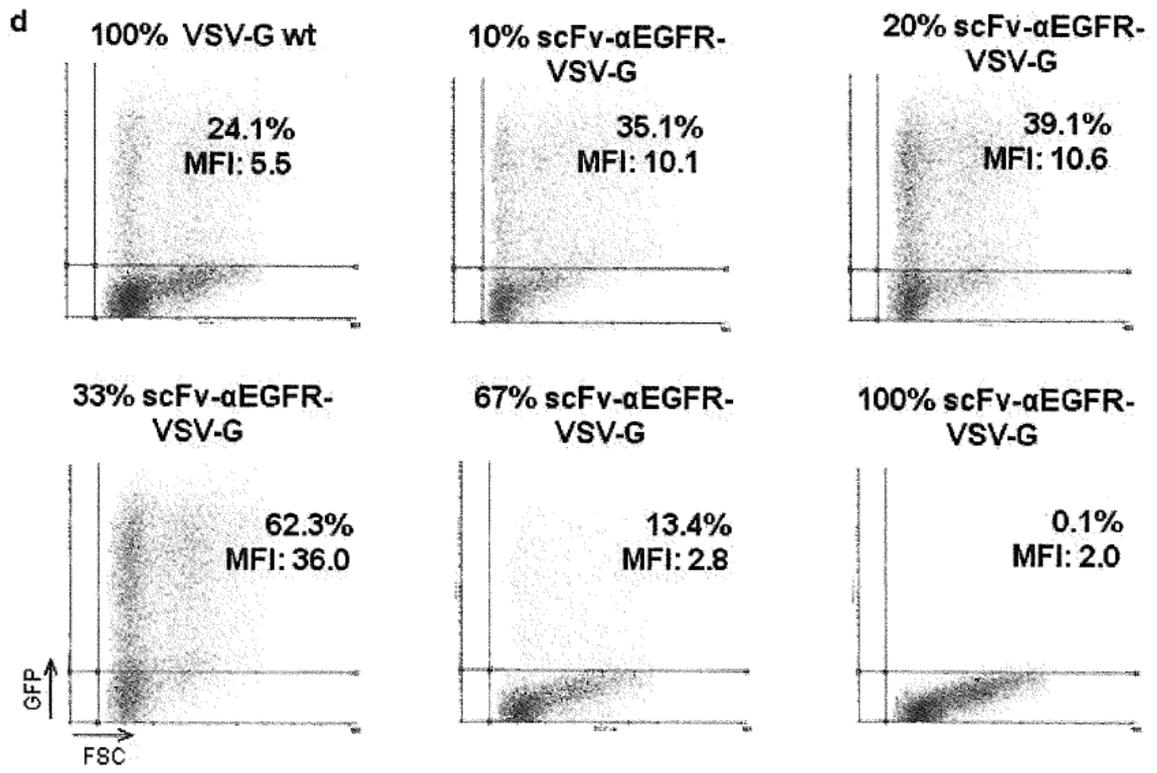


Figura 2 (continuación)

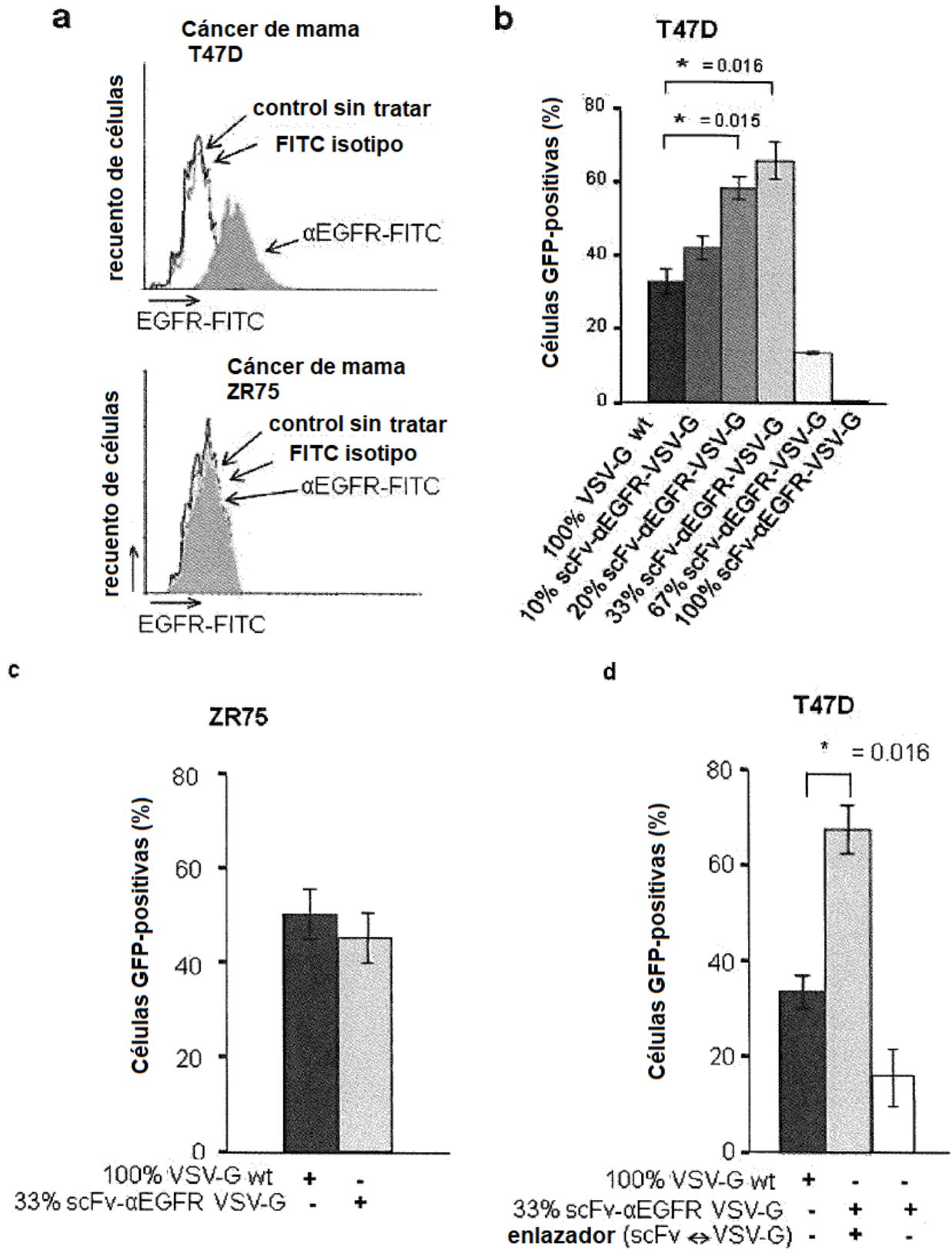
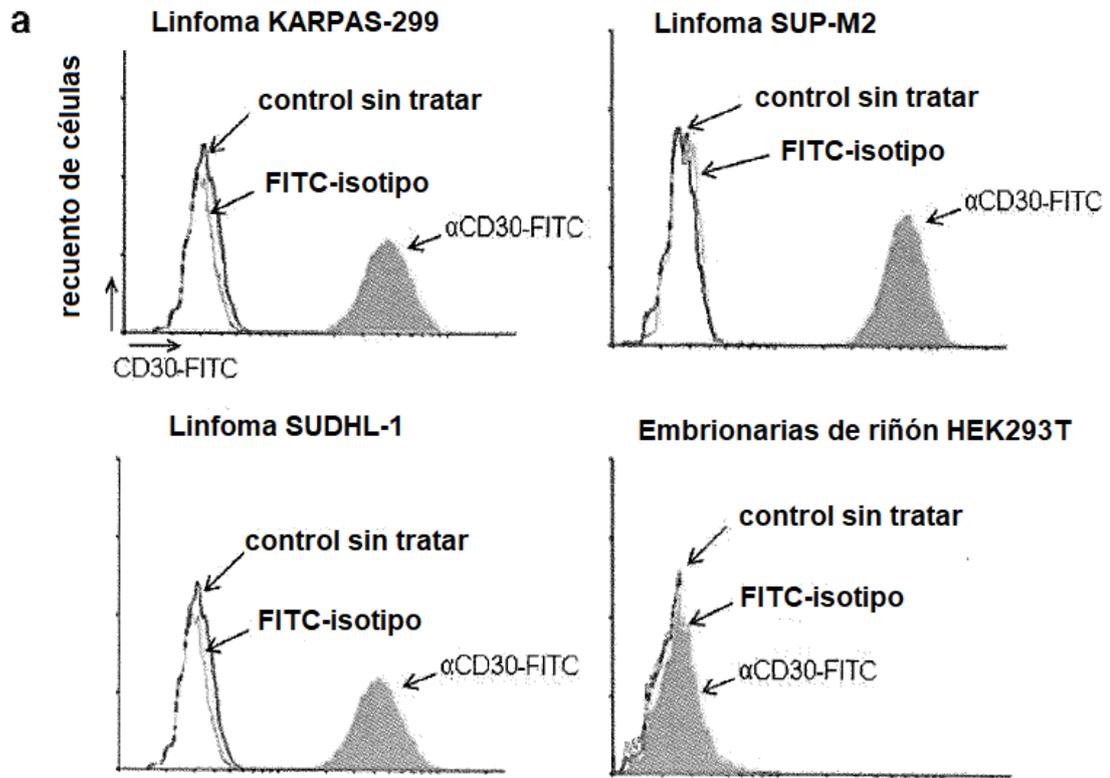
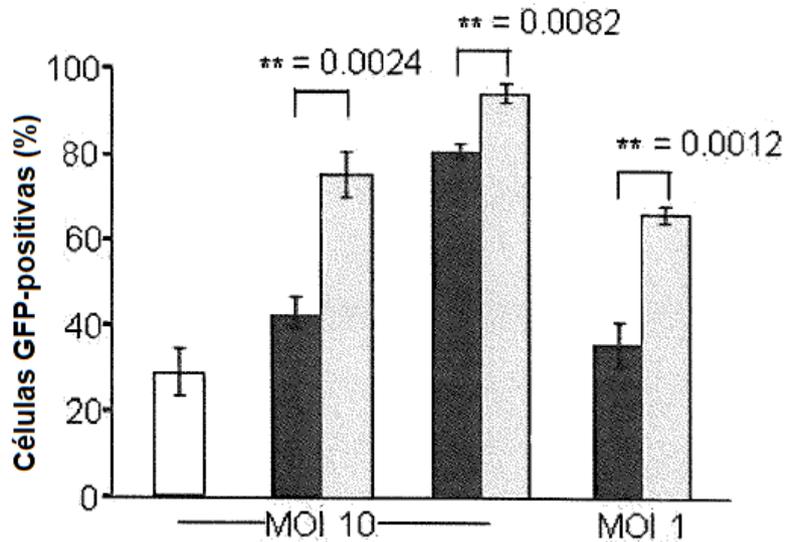


Figura 3



b

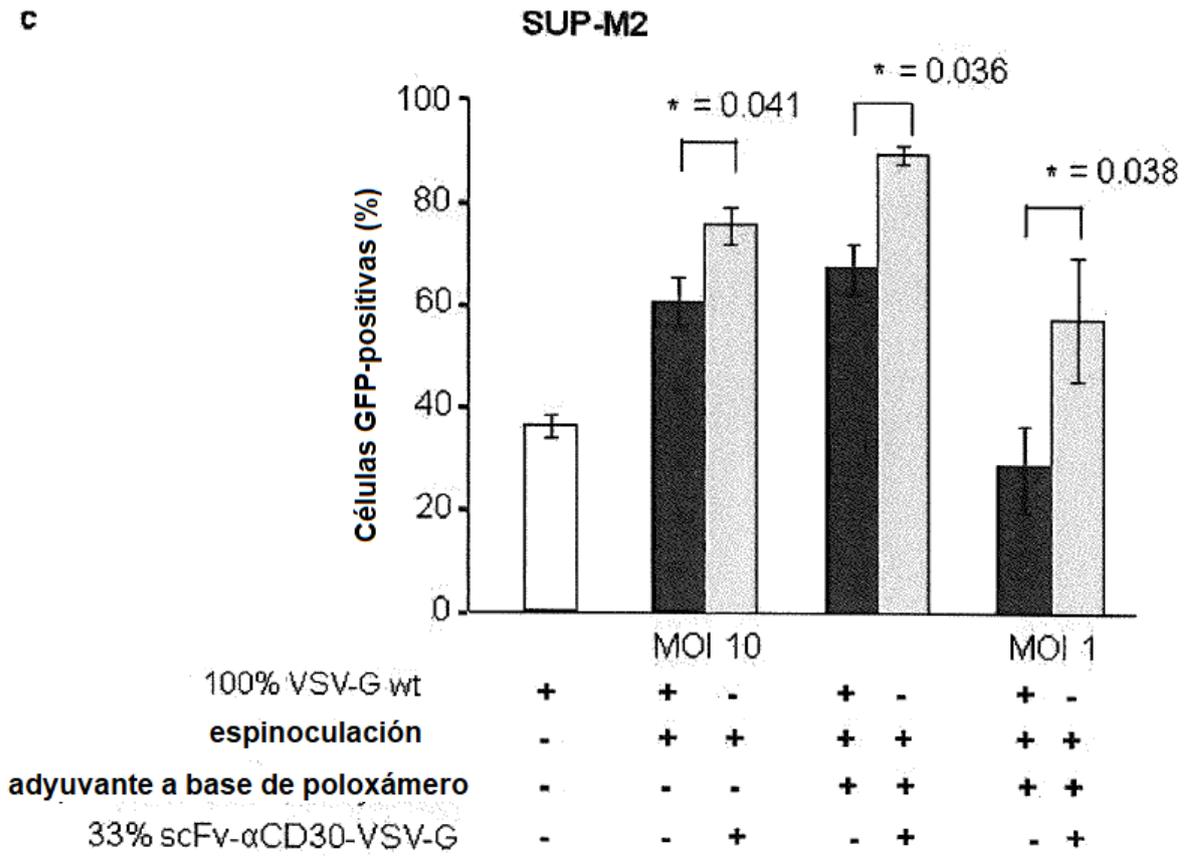
KARPAS-299



100% VSV-G wt	+	+	-	+	-	+	-
espinoculación	-	+	+	+	+	+	+
adyuvante a base de poloxámero	-	-	-	+	+	+	+
33% scFv- α CD30-VSV-G	-	-	+	-	+	-	+

Figure 4

c



d

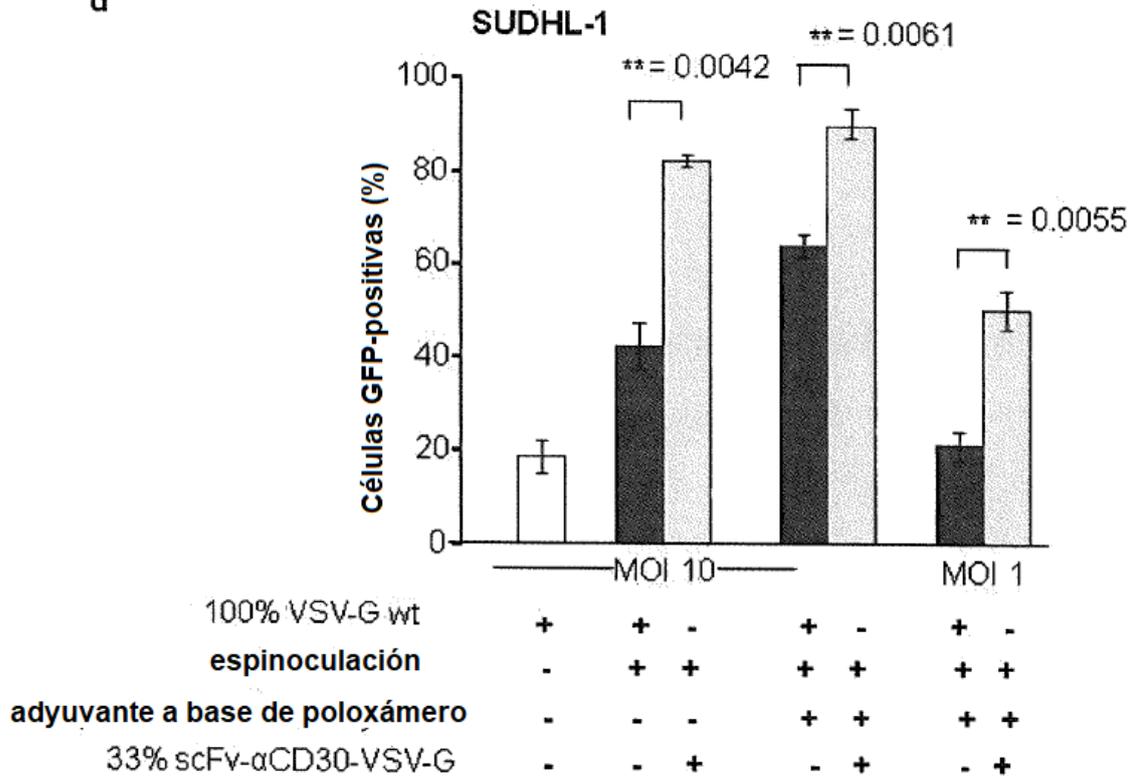


Figura 4 (continuación)

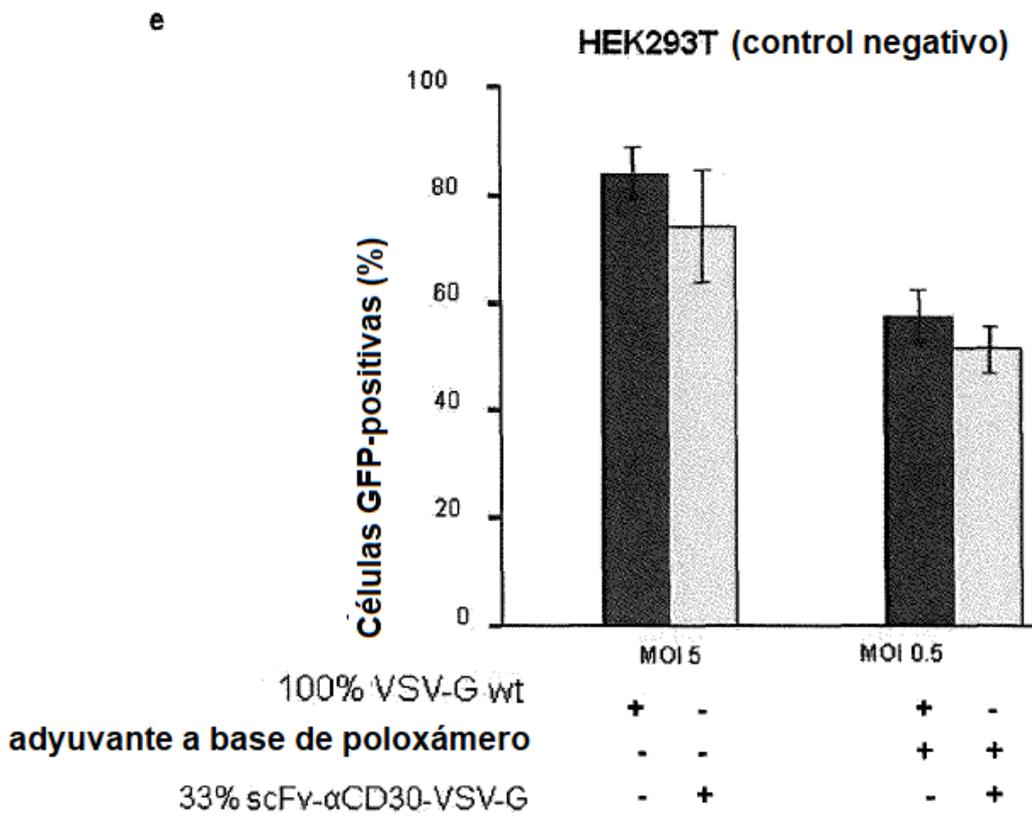


Figura 4 (continuación)

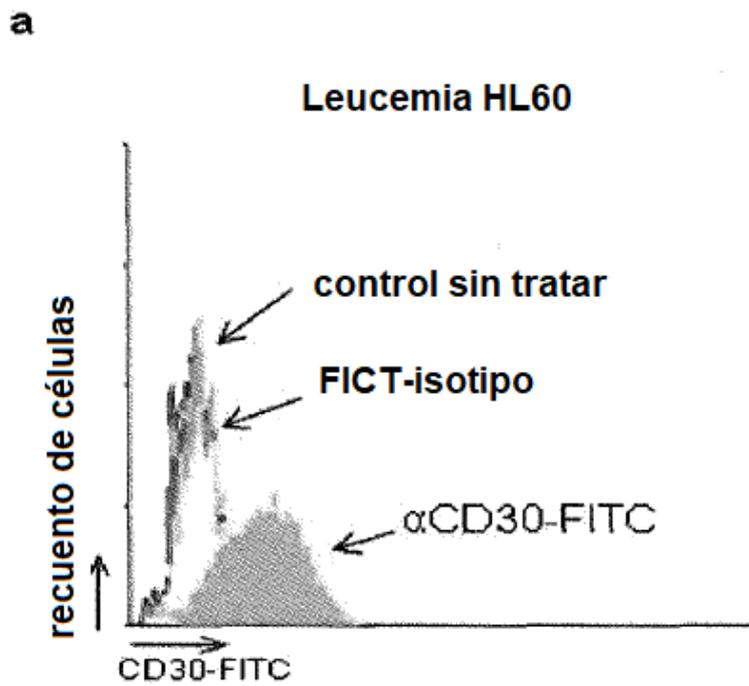


Figura 5

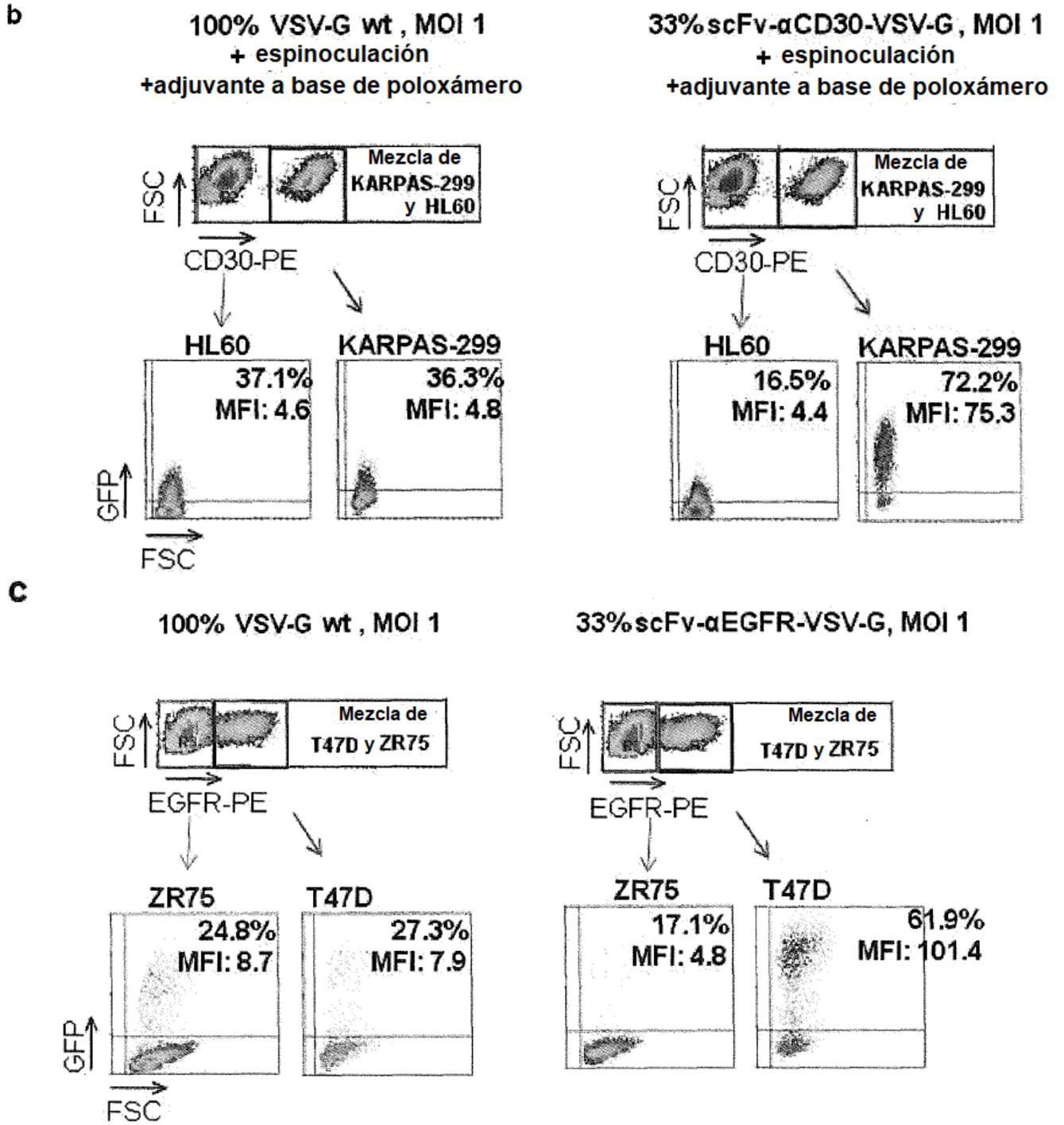


Figura 5 (continuación)

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

La lista de referencias citadas por el solicitante es, únicamente, para conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente europea. Si bien se ha tenido gran cuidado al compilar las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP declina toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- US 6080560 A [0024]
- US 4946778 A [0024]
- WO 2013127964 A [0095] [0097]
- EP 14150846 A [0148]

10 Literatura no patente citada en la descripción

- **BRAASCH ; COREY.** *Chemistry & Biology*, 2001, vol. 8, 1-7 [0011]
- **NIELSEN et al.** *Science*, 1991, vol. 254, 1497 [0011]
- **EGHOLM et al.** *Nature*, 1993, vol. 365, 666 [0011]
- **SAMBROOK ; RUSSEL.** *Molecular Cloning, A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, 2001 [0012] [0034]
- **HARLOW ; LANE.** *Antibodies, A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988 [0023]
- **HARLOW ; LANE.** *Using Antibodies: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999 [0023]
- **ALTSHULER EP ; SEREBRYANAYA DV ; KATRUKHA AG.** *Biochemistry (Mosc.)*, 2010, vol. 75 (13), 1584 [0024]
- **HARLOW E ; LANE D.** *Using Antibodies: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999 [0024]
- **KOZBOR D.** *Immunology Today*, 1983, vol. 4, 7 [0024]
- **LI J ; SAI T ; BERGER M ; CHAO Q ; DAVIDSON D ; DESHMUKH G ; DROZDOWSKI B ; EBEL W ; HARLEY S ; HENRY M.** *PNAS*, 2006, vol. 103 (10), 3557 [0024]
- **HOLLIGER P ; HUDSON PJ.** *Nat Biotechnol.*, 2005, vol. 23 (9), 11265 [0024]
- **GEBAUER ; SKERRA.** Engineered protein scaffolds as next-generation antibody therapeutics. *Curr Opin Chem Biol*, 2009, vol. 13, 245-255 [0025] [0038] [0043]
- **LICHTY JJ et al.** Comparison of affinity tags for protein purification. *Protein Expr Purif.*, May 2005, vol. 41 (1), 98-105 [0034]
- **BESTE, G. ; SCHMIDT, F.S. ; STIBORA, T. ; SKERRA, A.** Small antibody-like proteins with prescribed ligand specificities derived from the lipocalin fold. *PNAS*, 1999, vol. 96, 1898-903 [0041]
- **THOMPSON.** *Nucl. Acids Res.*, 1994, vol. 2, 4673-4680 [0052]
- **PEARSON ; LIPMAN.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1988, vol. 85, 2444 [0052]
- **ALTSCHUL.** *Nucl. Acids Res.*, 1977, vol. 25, 3389 [0052]
- **HENIKOFF.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1989, vol. 89, 10915 [0052]
- **SAMBROOK ; RUSSELL.** *Molecular Cloning, A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, 2001 [0057]
- **OWENS.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, vol. 98, 1471-1476 [0057]
- **COFFIN JM ; HUGHES SH ; VARMUS HE.** *Retroviruses.* Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1997 [0071]
- **O'CONNELL RM ; BALAZS AB ; RAO DS ; KIVORK C ; YANG L ; BALTIMORE D.** Lentiviral vector delivery of human interleukin-7 (hIL-7) to human immune system (HIS) mice expands T lymphocyte populations. *PLoS One*, 06 August 2010, vol. 5 (8), e12009 [0071]
- **MÁTRAI J ; CHUAH MK ; VANDENDRIESSCHE T.** Recent advances in lentiviral vector development and applications. *Mol Ther.*, March 2010, vol. 18 (3), 477-90 [0071]
- **BISCHOF et al.** Flexibility in cell targeting by pseudotyping lentiviral vectors. *Methods Mol Biol.*, 2010, vol. 614, 53-68 [0073]
- **BURNS et al.** Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 1993, vol. 90 (17), 8033-8037 [0073]
- **JACOME et al.** Lentiviral-mediated Genetic Correction of Hematopoietic and Mesenchymal Progenitor Cells From Fanconi Anemia Patients. *Mol Ther.*, June 2009, vol. 17 (6), 1083-1092 [0087]
- **CHU et al.** Efficient and Stable Gene Expression into Human Osteoclasts Using an HIV-1-Based Lentiviral Vector. *DNA Cell Biol.*, June 2008, vol. 27 (6), 315-320 [0087]
- **POCZOBUTT et al.** Benign mammary epithelial cells enhance the transformed phenotype of human breast cancer cells. *BMC Cancer*, 2010, vol. 10, 373 [0087]
- **HARGUS G et al.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, vol. 107, 15921-15926 [0088]
- **JAENISCH R. ; YOUNG R.** *Cell*, 2008, vol. 132, 567-582 [0088]

- SAHA K ; JAENISCH R. *Cell Stem Cell*, 2009, vol. 5, 584-595 [0088]
- KABANOV, A.; ZHU, J.; ALAKHOV, V. *Adv. Genet.*, 2005, vol. 53, 231-261 [0095] [0097]
- KABANOV, A et al. *Advances in Genetics*, 2005, vol. 53, 231-261 [0098]
- BUKRINSKY MI ; HAGGERTY S ; DEMPSEY MP ; SHAROVA N ; ADZHUBEL A ; SPITZ L et al. A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells. *Nature*, 1993, vol. 365, 666-669 [0147]
- GASPAR HB ; COORAY S ; GILMOUR KC ; PARSELEY KL ; ZHANG F ; ADAMS S et al. Hematopoietic stem cell gene therapy for adenosine deaminase-deficient severe combined immunodeficiency leads to long-term immunological recovery and metabolic correction. *Sci Transl Med*, 2011, vol. 3, 97ra80 [0147]
- GASPAR HB ; COORAY S ; GILMOUR KC ; PARSELEY KL ; ADAMS S ; HOWE SJ et al. Long-term persistence of a polyclonal T cell repertoire after gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *Sci Transl Med*, 2011, vol. 3, 97ra79 [0147]
- LAMB LS ; BOWERSOCK J ; DASGUPTA A ; GILLESPIE GY ; SU Y ; JOHNSON A et al. Engineered drug resistant $\gamma\delta$ T cells kill glioblastoma cell lines during a chemotherapy challenge: a strategy for combining chemo- and immunotherapy. *PLoS One*, 2013, vol. 8 (1), e51805 [0147]
- CHEN F ; CAI B ; GAO Y ; YUAN X ; CHENG F ; WANG T et al. Suicide gene-mediated ablation of tumor-initiating mouse pluripotent stem cells. *Biomaterials*, 2013, vol. 34 (6), 1701-1711 [0147]
- FINKELSHEIN D ; WERMAN A ; NOVICK D ; BARAK S ; RUBINSTEIN M. LDL receptor and its family members serve as the cellular receptors for vesicular stomatitis virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, vol. 110 (18), 7306-7311 [0147]
- BURNS JC ; FRIEDMANN T ; DRIEVER W ; BURRASCANO M ; YEE JK. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993, vol. 90, 8033-8037 [0147]
- LI Y ; DRONE C ; SAT E ; GHOSH HP. Mutational analysis of the vesicular stomatitis virus glycoprotein G for membrane fusion domains. *J Virol*, 1993, vol. 67, 4070-4077 [0147]
- STRAPPE PM ; HAMPTON DW ; CACHON-GONZALEZ B ; FAWCETT JW ; LEVER A. Delivery of a lentiviral vector in a Pluronic F127 gel to cells of the central nervous system. *Eur J Pharm Biopharm*, 2005, vol. 61, 126-133 [0147]
- WAEHLER R ; RUSSELL SJ ; CURIEL DT. Engineering targeted viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet*, 2007, vol. 8, 573-587 [0147]
- GUIBINGA GH ; HALL FL ; GORDON EM ; RUOSLAHTI E ; FRIEDMANN T. Ligand-modified vesicular stomatitis virus glycoprotein displays a temperature-sensitive intracellular trafficking and virus assembly phenotype. *Mol Ther*, 2004, vol. 9 (1), 76-84 [0147]
- KAMEYAMA Y ; KAWABE Y ; ITO A ; KAMIHIRA M. Antibody-dependent gene transduction using gammaretroviral and lentiviral vectors pseudotyped with chimeric vesicular stomatitis virus glycoprotein. *J Virol Methods*, 2008, vol. 153 (1), 49-54 [0147]
- PADMASHALI RM ; ANDREADIS ST. Engineering fibrinogen-binding VSV-G envelope for spatially- and cell-controlled lentivirus delivery through fibrin hydrogels. *Biomaterials*, 2011, vol. 32 (12), 3330-3339 [0147]
- DREJA H ; PIECHACZYK M. The effects of N-terminal insertion into VSV-G of an scFv peptide. *Virology*, 2006, vol. 3, 69 [0147]
- GUINIVAN P ; LADDA RL. Decrease in epidermal growth factor receptor levels and production of material enhancing epidermal growth factor binding accompany the temperature-dependent changes from normal to transformed phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1979, vol. 76 (7), 3377-3381 [0147]
- YEWALE C ; BARADIA D ; VHORA I ; PATIL S ; MISRA A. Epidermal growth factor receptor targeting in cancer: a review of trends and strategies. *Biomaterials*, 2013, vol. 34 (34), 8690-8707 [0147]
- UDAYACHANDER M ; MEENAKSHI A ; ANSAMMA J ; MUTHIAH R. Lymphoma-associated antigen (LAA): isolation, characterization and clinical evaluation. *Br J Cancer*, 1983, vol. 48 (5), 717-725 [0147]
- DEUTSCH YE ; TADMOR T ; PODACK ER ; ROSENBLATT JD. CD30: an important new target in hematologic malignancies. *Leuk Lymphoma*, 2011, vol. 52 (9), 1641-1654 [0147]
- MATTHEY B ; BORCHMANN P ; SCHNELL R ; TAWADROS S ; LANGE H ; HUHN M et al. Metalloproteinase inhibition augments antitumor efficacy of the anti-CD30 immunotoxin Ki-3(scFv)-ETA' against human lymphomas in vivo. *Int J Cancer*, 2004, vol. 111, 568-574 [0147]
- BRASCHOSS S ; HIRSCH B ; DUEBEL S ; STEIN H ; DUERKOP H. New anti-CD30 human pancreatic ribonuclease-based immunotoxin reveals strong and specific cytotoxicity in vivo. *Leuk Lymphoma*, 2007, vol. 48, 1179-1186 [0147]
- PARDO A ; STOECKER M ; KAMPMEIER F ; MELMER G ; FISCHER R ; THEPEN T et al. In vivo imaging of immunotoxin treatment using Katushka-transfected A-431 cells in a murine xenograft tumour model. *Cancer Immunol Immunother*, 2012, vol. 61, 1617-1626 [0147]

- **INGRAO D ; MAJDOUL S ; SEYE AK ; GALY A ; FENARD D.** Concurrent Measures of Fusion and Transduction Efficiency of Primary CD34+ Cells with Human Immunodeficiency Virus 1-Based Lentiviral Vectors Reveal Different Effects of Transduction Enhancers. *Hum Gene Ther Methods*, 2013 [0147]
- **HÖFIG I ; ATKINSON MJ ; MALL S ; KRACKHARDT AM ; THIRION C ; ANASTASOV N.** Poloxamer synperonic F108 improves cellular transduction with lentiviral vectors. *J Gene Med*, 2012, vol. 14, 549-560 [0147]
- **ANASTASOV N ; BONZHEIM I ; RUDELIUS M ; KLIER M ; DAU T ; ANGERMEIER D et al.** C/EBP β expression in ALK-positive anaplastic large cell lymphomas is required for cell proliferation and is induced by the STAT3 signaling pathway. *Haematologica*, 2010, vol. 95 (5), 760-767 [0147]
- **FUNKE S ; MAISNER A ; MUEHLEBACH MD ; KOEHL U ; GREZ M ; CATTANEO R et al.** Targeted cell entry of lentiviral vectors. *Mol Ther*, 2008, vol. 16, 1427-1436 [0147]
- **CORNETTA K ; ANDERSON WF.** Protamine sulfate as an effective alternative to polybrene in retroviral-mediated gene-transfer: implications for human gene therapy. *J Virol Methods*, 1989, vol. 23, 187-194 [0147]
- **TOYOSHIMA K ; VOGT PK.** Enhancement and inhibition of avian sarcoma viruses by polycations and polyanions. *Virology*, 1969, vol. 38, 414-426 [0147]
- **DAVIS HE ; ROSINSKI M ; MORGAN JR ; YARMUSH ML.** Charged polymers modulate retrovirus transduction via membrane charge neutralization and virus aggregation. *Biophys J*, 2004, vol. 86, 1234-1242 [0147]
- **HANENBERGH H ; XIAO XL ; DILLOO D ; HASHINO K ; KATO I ; WILLIAMS DA.** Colocalization of retrovirus and target cells on specific fibronectin fragments increases genetic transduction of mammalian cells. *Nat Med*, 1996, vol. 2, 876-882 [0147]
- **SANDRIN V ; BOSON B ; SALMON P ; GAY W ; NÈGRE D ; LE GRAND R et al.** Lentiviral vectors pseudotyped with a modified RD114 envelope glycoprotein show increased stability in sera and augmented transduction of primary lymphocytes and CD34+ cells derived from human and nonhuman primates. *Blood*, 2002, vol. 100, 823-832 [0147]
- **HAAS DL ; CASE SS ; CROOKS GM ; KOHN DB.** Critical factors influencing stable transduction of human CD34(+) cells with HIV-1-derived lentiviral vectors. *Mol Ther*, 2000, vol. 2, 71-80 [0147]
- **FENARD D ; INGRAO D ; SEYE A ; BUISSET J ; GENRIES S ; MARTIN S et al.** Vectofusin-1, a new viral entry enhancer, strongly promotes lentiviral transduction of human hematopoietic stem cells. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2013, vol. 2, e90 [0147]
- **WU DT ; SEITA Y ; ZHANG X ; LU CW ; ROTH MJ.** Antibody-directed lentiviral gene transduction for live-cell monitoring and selection of human iPS and hES cells. *PLoS One*, 2012, vol. 7, e34778 [0147]
- **ZHANG KX ; MOUSSAVI M ; KIM C ; CHOW E ; CHEN IS ; FAZLI L et al.** Lentiviruses with trastuzumab bound to their envelopes can target and kill prostate cancer cells. *Cancer Gene Ther*, 2009, vol. 16, 820-831 [0147]
- **MORIZONO K ; XIE Y ; RINGPIS GE ; JOHNSON M ; NASSANIAN H ; LEE B et al.** Lentiviral vector retargeting to P-glycoprotein on metastatic melanoma through intravenous injection. *Nat Med*, 2005, vol. 11, 346-352 [0147]
- **AYALA-BRETON C ; BARBER GN ; RUSSELL SJ ; PENG KW.** Retargeting vesicular stomatitis virus using measles virus envelope glycoproteins. *Hum Gene Ther*, 2012, vol. 23, 484-491 [0147]
- **FARLEY DC ; IQBALL S ; SMITH JC ; MISKIN JE ; KINGSMAN SM ; MITROPHANOUS KA.** Factors that influence VSV-G pseudotyping and transduction efficiency of lentiviral vectors - in vitro and in vivo implications. *J Gene Med*, 2007, vol. 9, 345-356 [0147]
- **SCHLEHUBER LD ; ROSE JK.** Prediction and identification of a permissive epitope insertion site in the vesicular stomatitis virus glycoprotein. *J Virol*, 2004, vol. 78 (10), 5079-5087 [0147]
- **YU JH ; SCHAFFER DV.** Selection of novel vesicular stomatitis virus glycoprotein variants from a peptide insertion library for enhanced purification of retroviral and lentiviral vectors. *J Virol*, 2006, vol. 80, 3285-3292 [0147]
- **KAIKKONEN MU ; LESCH HP ; PIKKARAINEN J ; RAETY JK ; VUORIO T ; HUHTALA T et al.** Streptavidin-displaying lentiviruses as versatile tools for targeting and dual imaging of gene delivery. *Gene Ther*, 2009, vol. 16, 894-904 [0147]
- **JEONG LEE H ; PARDRIDGE WM.** Drug targeting to the brain using avidin-biotin technology in the mouse. *J Drug Target*, 2000, vol. 8, 413-424 [0147]
- **ROCHE S ; ALBERTINI AA ; LEPAULT J ; BRESSANELLI S ; GAUDIN Y.** Structures of vesicular stomatitis virus glycoprotein: membrane fusion revisited. *Cell Mol Life Sci*, 2008, vol. 65, 1716-1728 [0147]
- **ALBERTINI AA ; MÉRIGOUX C ; LIBERSOU S ; MADIONA K ; BRESSANELLI S ; ROCHE S et al.** Characterization of monomeric intermediates during VSV glycoprotein structural transition. *PLoS Pathog*, 2012, vol. 8 (2), e1002556 [0147]
- **MILLINGTON M ; ARNDT A ; BOYD M ; APPLE-GATE T ; SHEN S.** Towards a Clinically Relevant Lentiviral Transduction Protocol for Primary Human CD34+ Hematopoietic Stem/Progenitor Cells. *PLoS ONE*, 2009, vol. 4 (7), e6461 [0147]
- **LEMBERG ; MARTOGLIO.** Requirements for signal peptide peptidase-catalyzed intramembrane proteolysis. *Mol Cell*, 2002, vol. 10 (4), 735-44 [0147]

- **SCHWARTZ.** Origins and evolution of cotranslational transport to the ER. *Adv Exp Med Biol.*, 2007, vol. 607, 52-60 [0147]
- **YEAGLE.** The Membranes of Cells. Academic Press, 1993 [0147]
- **LUCKEY.** Membrane Structural Biology: With Biochemical and Biophysical Foundations. Cambridge University Press, 2008 [0147]
- **YONEDA J ; SAIKI I ; IGARASHI Y ; KOBAYASHI H ; FUJII H ; ISHIZAKI Y ; KIMIZUKA F ; KATO I ; AZUMA I.** Role of the heparin-binding domain of chimeric peptides derived from fibronectin in cell spreading and motility. *Exp Cell Res.*, March 1995, vol. 217 (1), 169-79 [0147]
- **MICHALSKY,E. ; GOEDE,A. ; PREISSNER,R.** Loops In Proteins (LIP)-a comprehensive loop database for homology modelling. *Protein Eng.*, 2003, vol. 16, 979-985 [0147]
- **NOVELLA.** Contributions of vesicular stomatitis virus to the understanding of RNA virus evolution. *Curr Opin Microbiol.*, 2003, vol. 6 (4), 399-405 [0147]
- **LICHTY ; POWER ; STOJDL ; BELL.** Vesicular stomatitis virus: re-inventing the bullet. *Trends Mol Med.*, 2004, vol. 10 (5), 210-6 [0147]
- **REGAN ; WHITTAKER.** Entry of rhabdoviruses into animal cells. *Adv Exp Med Biol.*, 2013, vol. 790, 167-77 [0147]
- **MARTINEZ ; WERTZ.** Biological differences between vesicular stomatitis virus Indiana and New Jersey serotype glycoproteins: identification of amino acid residues modulating pH-dependent infectivity. *J Virol.*, 2005, vol. 79 (6), 3578-85 [0147]
- **FREDERICKSEN ; WHITT.** Vesicular stomatitis virus glycoprotein mutations that affect membrane fusion activity and abolish virus infectivity. *J. Virol.*, 1995, vol. 69, 1435-43 [0147]
- **SCHLEHUBER ; ROSE.** Prediction and identification of a permissive epitope insertion site in the vesicular stomatitis virus glycoprotein. *J Virol.*, 2004, vol. 78 (10), 5079-87 [0147]
- **YEE JK ; FRIEDMANN T ; BURNS JC.** Generation of high-titer pseudotyped retroviral vectors with very broad host range. *Methods Cell Biol.*, 1994, vol. 43, 99-112 [0147]
- **CRONIN J ; ZHANG XY ; REISER J.** Altering the tropism of lentiviral vectors through pseudotyping. *Curr Gene Ther.*, August 2005, vol. 5 (4), 387-98 [0147]
- **BARTOSCH B ; COSSET FL.** Strategies for retargeted gene delivery using vectors derived from lentiviruses. *Curr Gene Ther.*, December 2004, vol. 4 (4), 427-43 [0147]
- **FROELICH S ; TAI A ; WANG P.** Lentiviral vectors for immune cells targeting. *Immunopharmacol Immunotoxicol.*, June 2010, vol. 32 (2), 208-18 [0147]
- **NALDINI, L.** Lentiviruses as Gene Transfer Agents for Delivery to Non-dividing Cells. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 1998, vol. 9, 457-463 [0147]
- **ROBISON C.L. ; WHITT, M.A.** The Membrane-Proximal Stem Region of Vesicular Stomatitis Virus G Protein Confers Efficient Virus Assembly. *Journal of Virology*, March 2000, 2239-2246 [0147]
- **KLIMKA et al.** An anti-CD30 single-chain Fv selected by phage display and fused to Pseudomonas exotoxin A (Ki-4(scFv)-ETA') is a potent immunotoxin against a Hodgkin-derived cell line. *Br J Cancer.*, June 1999, vol. 80 (8), 1214-22 [0147]
- **KETTLEBOROUGH CA ; ANSELL KH ; ALLEN RW ; ROSELL-VIVES E ; GÜSSOW DH ; BENDIG MM.** Isolation of tumor cell-specific single-chain Fv from immunized mice using phage-antibody libraries and the re-construction of whole antibodies from these antibody fragments. *Eur J Immunol.*, April 1994, vol. 24 (4), 952-8 [0147]