

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 786 253**

51 Int. Cl.:

**C12P 21/04** (2006.01)

**C12N 5/071** (2010.01)

**C12N 5/00** (2006.01)

**C12N 5/0781** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2014 PCT/US2014/027910**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.09.2014 WO14152832**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2014 E 14768084 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2020 EP 2971039**

54 Título: **Métodos para la diferenciación y transducción in vitro de células B de memoria con vectores virales pseudotipados VSV-G**

30 Prioridad:

**14.03.2013 US 201361785490 P**

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

**09.10.2020**

73 Titular/es:

**IMMUSOFT CORPORATION (100.0%)  
454 N 34th Street  
Seattle, WA 98103, US**

72 Inventor/es:

**XU, MEI;  
SCHOLZ, MATTHEW REIN y  
HERBIG, ERIC J.**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**Observaciones:**

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

ES 2 786 253 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

Métodos para la diferenciación y transducción *in vitro* de células B de memoria con vectores virales pseudotipados VSV-G

5

**Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

Esta solicitud reivindica los derechos de prioridad de la solicitud provisional de Estados Unidos con n.º de serie 61/785.490 presentada el 14 de marzo de 2013.

10

**Antecedentes****Campo técnico**

15 La presente divulgación se refiere a la diferenciación *in vitro* de células B de memoria en plasmablastos y células plasmáticas y a la modificación genética de estas células para que expresen una proteína de interés, tal como un anticuerpo específico u otra proteína terapéutica.

**Descripción de la técnica relacionada**

20

Después de dejar la médula ósea, la célula B actúa como una célula presentadora de antígeno (APC) e internaliza antígenos. La célula B capta al antígeno mediante endocitosis mediada por receptor y lo procesa. El antígeno se procesa proporcionando péptidos antigénicos, cargados en moléculas del MHC II y presentados en la superficie extracelular de células B a células T auxiliares CD4+. Estas células T se unen a la molécula de MHC II/antígeno y provocan la activación de la célula B. Tras la estimulación por un célula T, la célula B activada comienza a diferenciarse en células más especializadas. Los células B del centro germinal pueden diferenciarse en células B de memoria o en células plasmáticas. La mayoría de estas células B se convertirán en plasmablastos y finalmente en células plasmáticas, y comenzarán a producir grandes volúmenes de anticuerpos (véase, por ejemplo, Trends Immunol. junio de 2009; 30(6): 277-285; Nature Reviews, 2005, 5:231 -242). La célula sanguínea más inmadura que se considera una célula plasmática en lugar de una célula B es el plasmablasto. Los plasmablastos secretan más anticuerpos que las células B, pero menos que las células plasmáticas. Se dividen rápidamente y siguen siendo capaces de internalizar antígenos y presentarlos a las células T. Una célula puede permanecer en este estado durante varios días y luego morir o diferenciarse irrevocablemente en una célula plasmática madura completamente diferenciada.

35

Las células plasmáticas diferenciadas terminalmente expresan relativamente pocos antígenos de superficie y no expresan marcadores celulares comunes pan-B, tales como CD19 y CD20. En cambio, las células plasmáticas se identifican mediante citometría de flujo por su expresión adicional de CD38, CD78 y el receptor de Interleucina-6 y por la ausencia de expresión de CD45. En seres humanos, CD27 es un buen marcador para las células plasmáticas, las células B vírgenes son CD27-, las células B de memoria son CD27+ y las células plasmáticas son CD27++. CD38 y CD138 se expresan a altos niveles en las células plasmáticas (véase Wikipedia, The Free Encyclopedia., Página "Plasma cell" Versión ID: 404969441; fecha de la última revisión: 30 de diciembre de 2010 09:54 UTC, recuperado el 4 de enero de 2011; Véanse también: Jourdan et al. Blood. 10 de diciembre de 2009; 114(25): 5173-81; Trends Immunol. junio de 2009; 30(6): 277-285; Nature Reviews, 2005, 5:231-242; Nature Med. 2010, 16:123-129; Neuberger, M. S.; Honjo, T.; Alt, Frederick W. (2004). Molecular biology of B cells. Amsterdam: Elsevier, págs. 189-191; Bertil Glader; Greer, John G.; John Foerster; Rodgers, George G.; Paraskevas, Frixos (2008). Wintrobe's Clinical Hematology, 2-Vol. Set. Hagerstown, MD: Lippincott Williams & Wilkins, pág. 347; Walport, Mark; Murphy, Kenneth; Janeway, Charles; Travers, Paul J. (2008). Janeway's immunobiology. New York: Garland Science, págs. 387-388; Rawstron AC (mayo de 2006). "Immunophenotyping of plasma cells". Curr Protoc Cytom).

50

Los retrovirus con pseudotipo convencional han demostrado una infectividad insuficiente de diversos tejidos y células. Por ejemplo, una diversidad de células madre, incluidas las células madre hematopoyéticas y las células B y T en reposo pueden ser células diana importantes en la terapia génica o similares (Y. Hanazono, Molecular Medicine, Vol. 36, N.º 7, 1999), pero la mayoría de estos tipos celulares se encuentran en un estado sin división (Abkowitz, J. L. et al., Nat Med, 2 (2), 190-7, 1996). En general, es difícil introducir genes usando un vector retroviral que presenta baja infectividad contra tales células que no están en división.

55

Los células T y B en reposo pueden transducirse eficazmente con vectores retrovirales pseudotipados con el virus del sarampión, glicoproteínas, H y F, en su superficie (véase, por ejemplo, Blood, 8 de octubre de 2009; 114(15):3173-80; Blood 2008 112:4843-4852). Sin embargo, existen informes contradictorios en la bibliografía con respecto a la capacidad de los vectores virales pseudotipados con VSV-G para transducir células B (véase, por ejemplo, Bovia et al., 2003 101:1727-1733; Serafini et al., Virology 325 (2004)413-424).

60

La modificación de las células que no se dividen tiene una importancia particular para la terapia génica y la inmunoterapia. Sin embargo, la capacidad de diferenciar y activar células B *in vitro* es una etapa importante en la preparación de células B modificadas para la infusión en sujetos. Las células B activadas y en división tampoco se

65

modifican genéticamente con facilidad. Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad en la técnica de mejorar los métodos y reactivos para modificar genéticamente de forma eficaz las células B *in vitro*. La presente divulgación proporciona vectores y métodos para modificar y diferenciar/activar células B de modo que puedan usarse eficazmente en aplicaciones profilácticas y terapéuticas. La presente divulgación proporciona esta y otras ventajas que se describen en la descripción detallada.

### Sumario de la invención

Un aspecto de la presente invención proporciona un método para expresar un ácido nucleico de interés en una célula B, que comprende, poner en contacto células B de memoria con una composición que comprende CD40L en combinación con un factor de activación de células B que comprende uno o más de los factores seleccionados del grupo que consiste en IL-2, IL-10, IL-15 y p-ODN; poner en contacto las células B de (a) con un factor de activación de células B que comprende uno o más de los factores seleccionados del grupo que consiste en IL-2, IL-10, IL-6 e IL-15; en condiciones tales que las células B de (b) expresen CD38; transducir las células B de (b) con un vector retroviral pseudotipado con VSV-G, en donde dicho vector retroviral comprende el ácido nucleico de interés unido operativamente a un promotor; y poner en contacto las células B transducidas de (c) con un factor de activación de células B que comprende uno o más de los factores seleccionados del grupo que consiste en IFN- $\alpha$ , IFN- $\delta$ , IL-6 e IL-15; expresando así el ácido nucleico de interés en la célula B. En una realización, el CD40L es sCD40L-his. En otra realización, la eficacia de la transducción es de aproximadamente un 20 % y, en algunas realizaciones, la eficacia de la transducción es superior al 20 %. En una realización adicional, el vector retroviral es un vector lentiviral. En una realización, el ácido nucleico de interés comprende un ácido nucleico que codifica al menos una región VL y VH de inmunoglobulina. En otra realización más, el ácido nucleico de interés codifica una proteína de anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno de la misma, una proteína de fusión o una molécula pequeña codificada por ADN. En ciertas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo anti-VIH, un anticuerpo anti-ARN o un anticuerpo que se une a una proteína involucrada en la regulación inmunológica. En otra realización de los métodos del presente documento, las células B de memoria se aíslan de sangre periférica. En algunas realizaciones de los métodos, las células B de la etapa (b) de los métodos son CD20-, CD38+ y CD138-. En otra realización más, las células B de la etapa (c) de los métodos son CD20-, CD38+ y CD138+.

### Breve descripción de algunas vistas de los dibujos

La Figura 1 es una serie de diagramas de puntos de citometría de flujo que muestran la transducción de células B con virus con proteína verde fluorescente (GFP) el Día 0 (DO), Día 4 (D4), Día 5 (D5), Día 6 (D6) y Día 7 (D7) de cultivo *in vitro*.

La Figura 2 es una serie de diagramas de puntos de citometría de flujo que muestran la diferenciación de células B de memoria durante 9 días de cultivo *in vitro*. En el eje y se muestra CD20 y en el eje x se muestra CD38.

La Figura 3 es un diagrama de puntos que muestra el crecimiento celular durante 9 días de cultivo *in vitro*. En el eje y se proporciona el cambio en veces en el número de células con respecto al número de células presentes el día 0 y a lo largo del eje x se proporciona el número de días en cultivo.

### Descripción detallada

La presente divulgación se refiere, en general, al cultivo de células B *in vitro* en condiciones para diferenciar células B de memoria en plasmablastos y células plasmáticas. La presente invención se refiere además a la modificación genética de células B para expresar un gen de interés y a la activación y cultivo de las células B modificadas para expresar la proteína codificada por el gen de interés. Estas células B modificadas activadas se administran después a un sujeto. Las composiciones y métodos descritos en el presente documento proporcionan la capacidad de diferenciar células B *in vitro* obtenidas de, por ejemplo, una simple extracción de sangre y, después, de transducir las células B diferenciadas con un ácido nucleico de interés de manera que secreten cantidades abundantes de la proteína codificada por el ácido nucleico de interés. Una ventaja particular de este sistema es que solo necesita aproximadamente 10 días para diferenciar un célula B de memoria en reposo en un plasmablasto o célula plasmática, que posteriormente se puede usar para la transducción y producción de una proteína de interés. Los sistemas conocidos en la técnica pueden necesitar hasta 10 semanas. Por lo tanto, la presente divulgación proporciona métodos que requieren menos tiempo en cultivo proporcionando ventajas comerciales y de seguridad en comparación con los métodos anteriores. Una ventaja adicional de la presente invención es que los métodos de cultivo *in vitro* proporcionan una eficacia de transducción incrementada hasta aproximadamente un 20 % de eficacia de transducción. Esto supone una mejora sobre las bajas eficacias de transducción de los métodos conocidos en la técnica. Los métodos de la presente invención tampoco requieren células de alimentación que son engorrosas para una producción que cumple las prácticas correctas de fabricación (GMP).

### Métodos de cultivo y transducción de células B

El ejemplo prototípico de células para usar con los métodos de transducción de la divulgación son células B. En ciertas realizaciones, las células B que se utilizarán en los métodos de esta divulgación pueden ser células B en

reposito, células B de memoria, células B preparadas o activadas, células de mieloma, células B de leucemia linfocítica o células de linfoma B. Sin embargo, un experto en la materia apreciará fácilmente que los vectores y métodos de la divulgación pueden aplicarse a otros tipos de células. A modo de ejemplo, los tipos de células que pueden cultivarse, diferenciarse, modificarse y activarse incluyen cualquier célula que normalmente no se divide o

5 está quiescente, tal como neuroblastos, células madre hematopoyéticas y células progenitoras hematopoyéticas (células CD34+), células madre mesenquimales, células progenitoras mesenquimales, células progenitoras y células madre neurales y hepáticas, células dendríticas, células T (células T CD8+ o CD4+), otras poblaciones de leucocitos, células madre pluripotentes, células madre multipotentes, etc. Por consiguiente, ciertas realizaciones de la presente divulgación proporcionan poblaciones de células resultantes de esta metodología. En ciertas realizaciones, los

10 métodos y vectores descritos en el presente documento pueden usarse para transducir cualquier otro tipo celular deseado, tal como hepatocitos, células epiteliales, osteoblastos, miocitos, fibroblastos, adipocitos, etc.

"Quiescente", tal y como se usa en el presente documento, se refiere a un estado celular en el que la célula no está proliferando de forma activa.

15 Antes de la diferenciación y la transducción, se obtiene una fuente de células B de un sujeto. Con el término "sujeto" se pretende incluir organismos vivos en los que se puede provocar una respuesta inmunológica adaptativa (por ejemplo, mamíferos). Los ejemplos de sujetos incluyen seres humanos, perros, gatos, ratones, ratas y especies transgénicas de los mismos. Las células B se pueden obtener de varias fuentes, incluyendo células mononucleares

20 de sangre periférica, médula ósea, tejido de ganglio linfático, sangre de cordón umbilical, tejido de un sitio de infección, tejido del bazo y tumores. En ciertas realizaciones de la presente divulgación, puede usarse cualquier cantidad de líneas de células B disponibles en la técnica. En ciertas realizaciones de los métodos descritos en el presente documento, las células B se pueden obtener de una unidad de sangre recogida de un sujeto utilizando cualquier número de técnicas conocidas por el experto en la materia, tales como separación en FICOLL™

25 (copolímeros de sacarosa y epiclorhidrina que pueden usarse para preparar soluciones de alta densidad). En una realización preferida, las células de la sangre circulante de un individuo se obtienen por aféresis o leucaféresis. El producto de aféresis normalmente contiene linfocitos, incluyendo células T, monocitos, granulocitos, células B, otros glóbulos blancos nucleados, glóbulos rojos y plaquetas. En una realización, las células recogidas por aféresis pueden lavarse para eliminar la fracción plasmática y para poner las células en un tampón o medio apropiado para

30 las etapas de procesamiento posteriores. En una realización de los métodos descritos en el presente documento, las células se lavan con solución salina tamponada con fosfato (PBS). En una realización alternativa, la solución de lavado carece de calcio y puede carecer de magnesio o puede carecer de muchos, si no de todos los cationes divalentes. Como apreciarán fácilmente los expertos en la materia, la etapa de lavado se puede realizar por métodos conocidos por los expertos en la materia, tal como mediante el uso de una centrífuga semiautomática de "flujo

35 continuo" (por ejemplo, el procesador de células Cobe 2991) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después del lavado, las células se pueden resuspender en una diversidad de tampones biocompatibles, tales como, por ejemplo, PBS. Como alternativa, se pueden eliminar los componentes indeseables de la muestra de aféresis y las células pueden resuspenderse directamente en medios de cultivo.

40 Las células B pueden aislarse de sangre periférica o por leucaféresis usando técnicas conocidas en este campo. Por ejemplo, Las PBMC pueden aislarse usando FICOLL™ (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) y las células B CD19+ pueden purificarse por selección negativa o positiva usando cualquiera de una diversidad de anticuerpos conocidos en este campo, tal como el sistema complejo tetramérico Rosette (StemCell Technologies, Vancouver, Canadá). En ciertas realizaciones, las células B de memoria se aíslan como describen Jourdan *et al.*, (Blood. 10 de diciembre de 2009;

45 114(25):5173-81). Por ejemplo, Después de la eliminación de las células CD2+ utilizando perlas magnéticas anti-CD2, las células B de memoria CD19+CD27+ pueden clasificarse por FACS. Las células plasmáticas de la médula ósea (BMPC) se pueden purificar usando clasificación con microperlas magnéticas anti-CD138 u otros métodos y reactivos similares.

50 En el mercado están disponibles otros kits de aislamiento, tales como el kit de aislamiento de células B MagCollect de R&D Systems (Minneapolis, MN). En ciertas realizaciones, pueden prepararse células B en reposo por sedimentación en gradientes discontinuos de Percoll, como se describe en (Defranco et al., (1982) J. Exp. Med. 155:1523).

55 La presente divulgación proporciona métodos para cultivar células B, tales como células B de memoria, para promover la diferenciación y activación de tal manera que las células B se transduzcan eficazmente con vectores virales que codifican una proteína de interés y produzcan activamente la proteína codificada por el transgén. A este respecto, las células B se activan y se diferencian en células plasmáticas o plasmablastos o en ambos tipos celulares. Como apreciará el experto, las células plasmáticas pueden identificarse mediante patrones de expresión

60 de proteínas de la superficie celular utilizando métodos de citometría de flujo convencionales. Por ejemplo, las células plasmáticas diferenciadas terminalmente expresan relativamente pocos antígenos de superficie y no expresan marcadores celulares comunes pan-B, tales como CD19 y CD20. En cambio, las células plasmáticas se identifican mediante citometría de flujo por su expresión adicional de CD38, CD78, CD138, el receptor de Interleucina-6 y la ausencia de expresión de CD45. En seres humanos, CD27 es un buen marcador para las células plasmáticas, las células B vírgenes son CD27-, las células B de memoria son CD27+ y las células plasmáticas son

65 CD27++. CD38 y CD138 se expresan a altos niveles en células plasmáticas. Por lo tanto, en ciertas realizaciones,

las células B utilizadas al principio de los métodos de cultivo *in vitro* descritos en el presente documento son CD20+, CD38-, CD138- y se transducen mal. Sin embargo, en una realización, después de ciertas etapas de los métodos de cultivo descritos en el presente documento, las células son principalmente CD20-, CD38+, CD138- y después de otras etapas de los métodos de cultivo *in vitro* descritos en el presente documento, las células son CD20-, CD38+, CD138+. Dichas células después se pueden usar para una transducción eficaz como se describe en el presente documento. En ciertas realizaciones, es deseable diferenciar y activar las células B antes de la transducción. En una realización, el fenotipo de las células en el día 6 puede describirse mejor como "activado", ya que tienen un fenotipo de superficie celular de CD20-CD38-CD138-CD27+.

En una realización, las células B pueden entrar en contacto con un factor de activación de células B, por ejemplo, cualquiera de una diversidad de citocinas, factores de crecimiento o líneas celulares que se sabe que activan y/o diferencian las células B (véase, por ejemplo, Fluckiger, et al. Blood 1998 92: 4509-4520; Luo, et al., Blood 2009 13: 1422-1431). Dichos factores pueden seleccionarse del grupo que consiste en, pero sin limitación, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, IL-30, IL-31, IL-32, IL-33, IL-34 e IL-35, IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\delta$ , quimiocinas de tipo C XCL1 y XCL2, quimiocinas de tipo C-C (que incluyen hasta ahora CCL1-CCL28) y quimiocinas de tipo CXC (que incluyen hasta ahora CXCL1-CXCL17), y miembros de la superfamilia TNF (por ejemplo, TNF- $\alpha$ , ligando 4-1 BB, factor de activación de células B (BLyS), ligando Fas, sCD40L (incluyendo las versiones multiméricas de sCD40L; por ejemplo, CD40L recombinante soluble marcado con histidina en combinación con mAb anti-poli-histidina para agrupar múltiples moléculas de sCD40L juntas), linfotoxina, OX40L, RANKL, TRAIL), CpG y otros agonistas de receptores de tipo toll (por ejemplo, CpG). En una realización, en particular, las células B (incluidas las células B transducidas) pueden ponerse en contacto o cultivarse en células alimentadoras. En otras realizaciones, el sistema de cultivo descrito en el presente documento se lleva a cabo en ausencia de células alimentadoras, proporcionando ventajas sobre otros sistemas conocidos en la técnica que requieren células alimentadoras. Cuando se pueden usar células alimentadoras, las células alimentadoras son una línea celular del estroma, por ejemplo, las líneas celulares estromales murinas S17 o MS5. En una realización adicional, las células CD19+ purificadas se pueden cultivar en presencia de fibroblastos que expresan el ligando de CD40 en presencia de citocinas de factor de activación de células B tales como IL-10 e IL-4. El CD40L también puede proporcionarse unido a una superficie tal como una placa de cultivo de tejidos o una perla. En otra realización, las células B purificadas pueden cultivarse en presencia o ausencia de células alimentadoras, con CD40L en presencia de una o más citocinas o factores seleccionados de IL-10, IL-4, IL-7, p-ODN, ADN CpG, IL-2, IL-15, IL6, IFN- $\alpha$  e IFN- $\delta$ .

En otra realización, los factores de activación de las células B pueden proporcionarse mediante transfección de la célula B u otra célula alimentadora. En este contexto, pueden usarse uno o más factores que promuevan la diferenciación de la célula B en una célula secretora de anticuerpos y/o uno o más factores que promuevan la longevidad de la célula productora de anticuerpos. Tales factores incluyen, por ejemplo, Blimp-1, TRF4, factores antiapoptóticos como Bcl-xl o Bcl5, o mutantes constitutivamente activos del receptor CD40. Además, en la activación/diferenciación de las células B también pueden usarse factores que promueven la expresión de moléculas de señalización aguas abajo, tales como factores asociados con el receptor de TNF (TRAF). A este respecto, la activación celular, la supervivencia celular y las funciones antiapoptóticas de la superfamilia de receptores de TNF están mediadas principalmente por TRAF1-6 (véase, por ejemplo, R.H. Arch, et al., Genes Dev. 12 (1998), págs. 2821-2830). Los efectores cadena abajo de la señalización TRAF incluyen factores de transcripción en la familia NF- $\kappa$ B y AP-1 que pueden activar a su vez genes involucrados en diversos aspectos de funciones celulares e inmunológicas. Además, se ha demostrado que la activación de NF- $\kappa$ B y AP-1 proporciona protección celular contra la apoptosis mediante la transcripción de genes antiapoptóticos.

En una realización adicional, pueden ser útiles proteínas derivadas del virus Epstein Barr (VEB) para la activación/diferenciación de células B o para promover la longevidad de la célula productora de anticuerpos. Las proteínas derivadas de VEB incluyen, pero sin limitación, EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3, LMP-1, LMP-2, EBER, miARN, EBV-EA, EBV-MA, EBV-VCA y EBV-AN.

En ciertas realizaciones, el contacto de las células B con factores de activación de células B utilizando los métodos proporcionados en el presente documento conduce a, entre otras cosas, la proliferación celular, la modulación del fenotipo IgM+ de la superficie celular a uno consistente con una célula B madura activada, la secreción de Ig y cambio de isotipo. Las células B CD19+ pueden aislarse usando kits de separación celular conocidos y disponibles en el mercado, tales como el sistema de separación celular MiniMacs (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Alemania). En ciertas realizaciones, los fibroblastos CD40L se irradian antes de su uso en los métodos descritos en el presente documento. En una realización adicional, las células progenitoras o células B pueden cultivarse en presencia de uno o más de IL-3, IL-7, ligando de Flt3, trombopoyetina, SCF, IL-2, IL-10, G-CSF y CpG. En ciertas realizaciones, los métodos incluyen el cultivo de las células B o células progenitoras en presencia de uno o más de los factores mencionados anteriormente junto con células estromales transformadas (por ejemplo, MS5) que proporcionan un bajo nivel de CD40L anclado o CD40L unido a una placa o una perla.

Se puede usar cualquiera de una diversidad de medios de cultivo en los presentes métodos como sabrá el experto (véase, por ejemplo, Current Protocols in Cell Culture, 2000-2009 por John Wiley & Sons, Inc.). En una realización, los medios para su uso en los métodos descritos en el presente documento incluyen, pero sin limitación, el medio

Dulbecco modificado por Iscove (con o sin suero bovino fetal u otro suero apropiado). Los medios ilustrativos también incluyen, pero sin limitación, IMDM, RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM, a-MEM, F-12, X-Vivo 15 y X-Vivo 20. En realizaciones adicionales, el medio puede comprender un tensioactivo, un anticuerpo, plasmanate o un agente reductor (por ejemplo, N-acetil-cisteína, 2-mercaptoetanol), o uno o más antibióticos. En algunas realizaciones,

5 también pueden usarse IL-6, CD40L soluble y un potenciador del entrecruzamiento.

Las células B o las células progenitoras pueden cultivarse en condiciones y durante períodos de tiempo suficientes para conseguir la diferenciación y la activación deseada. En ciertas realizaciones, las células B o las células progenitoras se cultivan en condiciones y durante períodos de tiempo suficientes tales que se diferencian y/o activan,

10 según se desee, un 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o incluso un 100 % de las células B. En una realización, las células B se activan y se diferencian en células plasmáticas. Como apreciará el experto, los plasmablastos y las células plasmáticas pueden identificarse mediante patrones de expresión de proteínas de la superficie celular utilizando métodos de citometría de flujo convencionales como se describe en otra parte del presente documento, tal como mediante expresión de CD38,

15 CD78, el receptor de Interleucina-6, CD27<sup>high</sup> y CD138, y la ausencia de expresión de marcadores celulares comunes pan-B, tales como CD19 y CD20, y la ausencia de expresión de CD45. Como entenderá el experto, las células B de memoria son generalmente CD20<sup>+</sup> CD19<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup> mientras que los plasmablastos en sus primeras fases son CD20<sup>-</sup> CD19<sup>+</sup> CD27<sup>++</sup> CD38<sup>++</sup>. En ciertas realizaciones, la población inicial en los métodos descritos en el presente documento son CD20<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD138<sup>-</sup> (estas células generalmente se transducen mal). En una realización, las células cultivadas usando los métodos descritos en el presente documento son CD20<sup>-</sup>, CD38<sup>+</sup>, CD138<sup>-</sup> y, en otra realización, las células pueden tener un fenotipo de CD20<sup>-</sup>, CD38<sup>+</sup>, CD138<sup>+</sup>, dependiendo del día de cultivo en el que se examinen las células y de qué factores se utilicen en el medio. En ciertas realizaciones, las células se cultivan durante 1-7 días. En realizaciones adicionales, las células se cultivan 7, 14, 21 días o más. Por lo tanto, las células pueden cultivarse en condiciones apropiadas durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15,

20 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o más días. Las células se vuelven a poner en placas, y pueden añadirse o cambiarse medios y suplementos cuando sea necesario utilizando técnicas conocidas en este campo.

En ciertas realizaciones, las células B o las células progenitoras (antes o después de la transducción) pueden cultivarse en condiciones y durante períodos de tiempo suficientes tales que al menos un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o un 100 % de las células se diferencien y activen para producir Ig y/o expresar el transgén de interés.

La inducción de la activación de células B se puede medir mediante técnicas tales como la incorporación de <sup>3</sup>H-uridina en el ARN (a medida que se diferencian las células B, aumenta la síntesis de ARN), o mediante la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina, que mide la síntesis de ADN asociada con la proliferación celular. Para una medición óptima de la proliferación de células B, se puede añadir interleucina-4 (IL-4) al medio de cultivo a una concentración adecuada, tal como aproximadamente 10 ng/ml.

Como alternativa, la activación de células B puede medirse en función de la secreción de inmunoglobulina. Por ejemplo, se puede añadir CD40L a células B en reposo junto con IL-4 (por ejemplo, 10 ng/ml) e IL-5 (por ejemplo, 5 ng/ml) u otras citocinas adecuadas para la activación de células B. También puede utilizarse citometría de flujo para medir marcadores de la superficie celular típicos de las células B activadas. Véanse, por ejemplo, Civin CI, Loken MR, Int'l J. Cell Cloning ^ 987; 5:1 -16; Loken, MR, et al, Flow Cytometry Characterization of Erythroid, Lymphoid and Monomyeloid Lineages in Normal Human Bone Marrow, in Flow Cytometry in Hematology, Laerum OD, Bjerknes R. eds., Academic Press, Nueva York, 1992; págs. 31-42; y LeBein TW, et al, Leukemia 1990; 4:354-358.

Después del cultivo durante un período de tiempo apropiado, tal como de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o más días, generalmente de aproximadamente 3 días, se puede añadir un volumen adicional de medio de cultivo. El sobrenadante de cultivos individuales puede recogerse en diversos momentos durante el cultivo y cuantificarse con respecto a la IgM y la IgG1 como se describe en Noelle et al., (1991 ) J. Immunol. 146:1118-1124. En realizaciones adicionales, los cultivos pueden recogerse y medirse con respecto a la expresión del transgén de interés usando citometría de flujo, ELISA, ELISPOT u otro ensayo conocido en la técnica.

En realizaciones adicionales, puede usarse el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para medir la producción de IgM u otro isotipo de anticuerpo o para la producción del transgén de interés. En ciertas realizaciones, las determinaciones de IgG pueden realizarse utilizando anticuerpos disponibles en el mercado tales como IgG antihumana de cabra, como anticuerpo de captura, seguido de la detección utilizando cualquiera de una diversidad de reactivos de detección apropiados tales como Ig antihumana de cabra biotinilada, fosfatasa alcalina con estreptavidina y sustrato.

Las células B, u otras células de interés, pueden transducirse con los vectores retrovirales descritos en el presente documento usando cualquiera de una diversidad de técnicas conocidas en este campo (véase, por ejemplo, Science, 12 de abril de 1996, 272: 263-267; Blood 2007, 99:2342-2350; Blood 2009, 1 13:1422-1431; Blood 8 de octubre de 2009; 1 14(15):3173-80; Blood. 2003;101 (6):2167-2174; Current Protocols in Molecular Biology or Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y.(2009)). Por ejemplo, Las PBM, las células B o T procedentes de donantes y otras células cancerosas que son células B, tales como células B-CLL, pueden aislarse y cultivarse en

- medio IMDM o RPMI 1640 (GibcoBRL Invitrogen, Auckland, Nueva Zelanda) u otro medio adecuado como se describe en el presente documento, sin suero o complementado con FCS al 10 % y penicilina/estreptomicina y/u otros complementos adecuados tales como transferrina y/o insulina. En ciertas realizaciones, las células se siembran en una cantidad de 1 E5 células en placas de 48 pocillos y el vector concentrado se añade a diversas dosis que el experto puede optimizar habitualmente utilizando metodologías de rutina. En ciertas realizaciones, las células B pueden transferirse a la monocapa de células MS5 en RPMI complementado con suero AB al 10 %, FCS al 5 %, rhSCF a 50 ng/ml, rhIL-15 a 10 ng/ml y rhIL-2 a 5 ng/ml y medio renovado periódicamente según sea necesario. Como apreciará el experto, se pueden utilizar otros medios y complementos adecuados cuando se desee.
- En una realización, las células B cultivadas como se describe en el presente documento que van a diferenciarse se ponen en contacto con un vector retroviral como se describe en el presente documento que comprende un ácido nucleico de interés unido operativamente a un promotor, en condiciones suficientes para transducir al menos una porción de las células B. En una realización, las células B se ponen en contacto con un vector retroviral como se describe en el presente documento que comprende un ácido nucleico de interés unido operativamente a un promotor, en condiciones suficientes para transducir al menos el 20 % de las células B. En una realización adicional, las células B se ponen en contacto con un vector como se describe en el presente documento en condiciones suficientes para transducir al menos el 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o incluso el 100 % de las células B en reposo. En una realización particular se transducen las células B diferenciadas y activadas, cultivadas *in vitro* como se describe en el presente documento, en cuyo caso las células B cultivadas diferenciadas/activadas se ponen en contacto con un vector como se describe en el presente documento en condiciones suficientes para transducir al menos el 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99% o incluso el 100% de las células B diferenciadas y activadas.
- En ciertas realizaciones, antes de la transducción, las células se estimulan previamente con *Staphylococcus Aureus* Cowan (SAC; Calbiochem, San Diego, CA); IL-2 para células B o con anti-hCD3/anti-hCD28/IL-2 para células T, a concentraciones apropiadas conocidas por el experto y optimizadas rutinariamente. Se pueden usar otros factores de activación de células B (por ejemplo, PMA), como se conoce por el experto en la materia y se describe en el presente documento.

### **Vectores virales**

- Ciertas realizaciones emplean vectores virales para transducir células plasmáticas tales como células B con los sistemas de expresión descritos en el presente documento. Los ejemplos de vectores virales incluyen, sin limitación, vectores basados en adenovirus, vectores basados en virus adenoasociados (VAA), vectores retrovirales, vectores retrovirales-adenovirales y vectores derivados de virus del herpes simple (VHS), incluidos vectores amplicones, VHS con replicación defectuosa y VHS atenuado (véase, por ejemplo, Krisky, *Gene Ther.* 5: 1517-30, 1998; Pfeifer, *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2:177-211, 2001).
- Ciertas realizaciones se refieren al uso de vectores retrovirales, o vectores derivados de retrovirus. Los "retrovirus" son virus de ARN envueltos que son capaces de infectar células animales y que utilizan la enzima transcriptasa inversa en las primeras etapas de la infección para generar una copia de ADN a partir de su genoma de ARN, que después se integra normalmente en el genoma del hospedador. Son ejemplos de vectores retrovirales vectores derivados del virus de la leucemia murina de Moloney (MLV), vectores retrovirales basados en un virus de células madre murinas, que proporciona una expresión estable a largo plazo en células diana tales como células precursoras hematopoyéticas y su progenie diferenciada (véase, por ejemplo, Hawley et al., *PNAS USA* 93:10297-10302, 1996; Keller et al., *Blood* 92:877-887, 1998), vectores híbridos (véase, por ejemplo, Choi, et al., *Stem Cells* 19:236-246, 2001) y vectores complejos derivados de retrovirus, tales como vectores lentivirales.
- Como se ha indicado anteriormente, ciertas realizaciones emplean vectores lentivirales. El término "lentivirus" se refiere a un género de retrovirus complejos que son capaces de infectar tanto células en división como células que no se están dividiendo. Los ejemplos de lentivirus incluyen el VIH (virus de la inmunodeficiencia humana; incluyendo VIH tipo 1 y VIH tipo 2), maedi-visna, el virus de la artritis-encefalitis caprina, el virus de la anemia infecciosa equina, el virus de la inmunodeficiencia felina (VIF), el virus de la inmunodeficiencia bovina (VIB) y virus de la inmunodeficiencia en simios (VIS). Los vectores lentivirales pueden proceder de uno o más de estos lentivirus (véase, por ejemplo, Evans et al., *Hum Gene Ther.* 10:1479-1489, 1999; Case et al., *PNAS USA* 96:2988-2993, 1999; Uchida et al., *PNAS USA* 95:1 1939-1 1944, 1998; Miyoshi et al., *Science* 283:682-686, 1999; Sutton et al., *J Virol* 72:5781 -5788, 1998; y Frecha et al., *Blood.* 1 12:4843-52, 2008).
- Se ha documentado que las células T y B en reposo pueden transducirse por un LV recubierto con VSVG que porta la mayoría de las proteínas accesorias del VIH (vif, vpr, vpu y nef) (véase, por ejemplo, Frecha et al., 2010 *Mol. Therapy* 18:1748). En ciertas realizaciones, el vector retroviral comprende ciertas secuencias mínimas de un genoma de lentivirus, tal como el genoma de VIH o el genoma de VIS. El genoma de un lentivirus normalmente se organiza en una región de repetición terminal larga (LTR) 5', el gen gag, el gen pol, el gen env, los genes accesorios (por ejemplo, net, vif, vpr, vpu, tat, rev) y una región LTR 3'. El LTR viral se divide en tres regiones denominadas U3, R (repetición) y U5. La región U3 contiene los elementos potenciador y promotor, la región U5 contiene las señales

de poliadenilación y la región R separa las regiones U3 y U5. Las secuencias transcritas de la región R aparecen en los extremos tanto 5' como 3' del ARN viral (véase, por ejemplo, "RNA Viruses: A Practical Approach" (Alan J. Cann, Ed., Oxford University Press, 2000); O Narayan, J. Gen. Virology. 70:1617-1639, 1989; Fields et al., Fundamental Virology Raven Press., 1990; Miyoshi et al., J Virol. 72:8150-7,1998; y la patente de Estados Unidos N.º 6.013.516).

5 Los vectores lentivirales pueden comprender uno cualquiera o más de estos elementos del genoma lentiviral, para regular la actividad del vector cuando se desee, o pueden contener deleciones, inserciones, sustituciones o mutaciones en uno o más de estos elementos, tal como para reducir los efectos patológicos de la replicación lentiviral o limitar el vector lentiviral a una sola ronda de infección.

10 Normalmente, un vector retroviral mínimo comprende ciertas secuencias LTR 5' y LTR 3', uno o más genes de interés (que se expresarán en la célula diana), uno o más promotores, y una secuencia de acción en cis para el empaquetamiento del ARN. Se pueden incluir otras secuencias reguladoras, como se describe en el presente documento y se conoce en la técnica. El vector viral normalmente se clona en un plásmido que puede introducirse por transfección en una línea celular de empaquetamiento, tal como una célula eucariota (por ejemplo, 293-HEK) y  
15 normalmente también comprende secuencias útiles para la replicación del plásmido en bacterias.

En ciertas realizaciones, el vector viral comprende secuencias de las LTR 5' y/o 3' de un retrovirus tal como un lentivirus. Las secuencias LTR pueden ser secuencias LTR de cualquier lentivirus de cualquier especie. Por ejemplo, pueden ser secuencias LTR de VIH, VIS, VIF o VIB. Preferentemente, las secuencias LTR son secuencias LTR de  
20 VIH.

En ciertas realizaciones, el vector viral comprende las secuencias R y U5 de la LTR 5' de un lentivirus y una LTR 3' inactivada o "de autoinactivación" de un lentivirus. Una "LTR 3' de autoinactivación" es una repetición terminal larga (LTR) 3' que contiene una mutación, sustitución o deleción que impide que las secuencias LTR dirijan la expresión de un gen cadena abajo. Una copia de la región U3 de la LTR 3' actúa como molde para la generación de las dos  
25 LTR en el provirus integrado. Por lo tanto, cuando la LTR 3' con una mutación o deleción de inactivación se integra como la LTR 5' del provirus, no es posible la transcripción a partir de la LTR 5'. Esto elimina la competencia entre el potenciador/promotor viral y cualquier potenciador/promotor interno. Se describen LTR 3' de autoinactivación, por ejemplo, en Zufferey et al., J Virol. 72:9873-9880, 1998; Miyoshi et al., J Virol. 72:8150-8157, 1998; e Iwakuma et al.,  
30 Wro/ogy 261: 120-132, 1999. Las LTR 3' de autoinactivación pueden generarse por cualquier método conocido en la técnica. En ciertas realizaciones, el elemento U3 de la LTR 3' contiene una deleción de su secuencia potenciadora, preferentemente la caja TATA y sitios Spl y/o NF-kappa B. Como resultado de la LTR 3' de autoactivación, el provirus que se integra en el genoma de la célula hospedadora comprenderá una LTR 5' inactivada.

35 Los vectores virales proporcionados en el presente documento comprenden normalmente un gen que codifica una proteína (u otra molécula, tal como ARNip) que se expresa deseablemente en una o más células diana. Preferentemente, el gen de interés se encuentra entre las secuencias LTR 5' y LTR 3'. Además, el gen de interés está preferentemente en una relación funcional con otros elementos genéticos, por ejemplo, secuencias reguladoras de la transcripción tales como promotores y/o potenciadores, para regular la expresión del gen de interés de una  
40 manera particular una vez que el gen se ha incorporado en la célula diana. En ciertas realizaciones, las secuencias reguladoras de la transcripción útiles son aquellas que están altamente reguladas con respecto a la actividad, tanto temporal como espacialmente.

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

50 En ciertas realizaciones, un gen que codifica una proteína marcadora puede estar situado antes o después del gen primario para permitir la identificación de las células que expresan la proteína deseada. Ciertas realizaciones incorporan una proteína marcadora fluorescente, tal como la proteína verde fluorescente (GFP) o la proteína roja fluorescente (RFP), junto con el gen primario de interés. Si se incluyen uno o más genes informadores adicionales, también se pueden incluir secuencias IRES o elementos 2A, separando el gen primario de interés de un gen  
55 informador y/o cualquier otro gen de interés.

Ciertas realizaciones pueden emplear genes que codifican uno o más marcadores de selección. Los ejemplos incluyen marcadores de selección que son eficaces en una célula eucariota o una célula procariota, tales como un gen de resistencia a fármacos que codifica un factor necesario para la supervivencia o el crecimiento de células  
60 hospedadoras transformadas cultivadas en un medio de cultivo selectivo. Ciertos genes de selección ejemplares codifican proteínas que confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, G418, higromicina B, puromicina, zeocina, ouabaína, blastidina, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, complementan deficiencias auxotróficas o suministran elementos, y pueden estar presentes en un plásmido separado e introducirse por cotransfección con el vector viral. Ciertas realizaciones distintas pueden emplear genes que codifican uno o  
65 receptores de la superficie celular que pueden usarse para el etiquetado y detección o purificación de células transfectadas (por ejemplo, receptor de factor de crecimiento nervioso de baja afinidad (LNGFR) u otros receptores

similares útiles como sistemas de etiquetado de transducción. Véanse, por ejemplo, Lauer *et al.*, *Cancer Gene Ther* 2000 Mar; 7(3):430-7).

5 Ciertos vectores virales, tales como los vectores retrovirales, emplean uno o más promotores heterólogos, potenciadores o ambas cosas. En ciertas realizaciones, la secuencia U3 de una LTR 5' retroviral o lentiviral puede reemplazarse con una secuencia promotora o potenciadora en la construcción viral. Ciertas realizaciones emplean un promotor/potenciador "interno" que se encuentra entre las secuencias LTR 5' y LTR 3' del vector viral y está unido operativamente al gen de interés. Una "relación funcional" y "unido operablemente" significan, sin limitación, que el gen está en la ubicación y orientación correctas con respecto al promotor y/o potenciador, de tal manera que la expresión del gen se verá afectada cuando el promotor y/o potenciador entren en contacto con las moléculas reguladoras apropiadas. Se puede usar cualquier combinación potenciador/promotor que regule (por ejemplo, aumente o disminuya) la expresión del genoma viral de ARN en la línea celular de empaquetamiento, regule la expresión del gen de interés seleccionado en una célula diana infectada, o ambas cosas.

15 Un promotor es un elemento de control de la expresión formado por una secuencia de ADN que permite que se produzca la unión de la ARN polimerasa y la transcripción. Los promotores son secuencias no traducidas que están situadas cadena arriba (5') del codón de inicio de un gen de interés seleccionado (normalmente a una distancia no mayor de aproximadamente 100 a 1000 pb) y controlan la transcripción y traducción de la secuencia polinucleotídica codificante a la que están unidos operativamente. Los promotores pueden ser inducibles o constitutivos. Los promotores inducibles inician mayores niveles de transcripción del ADN bajo su control en respuesta a algún cambio en las condiciones de cultivo, tal como un cambio de temperatura.

25 En la técnica se conoce una diversidad de promotores, al igual que métodos para unir operativamente el promotor a la secuencia codificante polinucleotídica. Se pueden usar tanto secuencias promotoras nativas como muchos promotores heterólogos para dirigir la expresión del gen de interés seleccionado. Ciertas realizaciones emplean promotores heterólogos, porque generalmente permiten una mayor transcripción y mayores rendimientos de la proteína deseada en comparación con el promotor nativo.

30 Ciertas realizaciones pueden emplear promotores virales heterólogos. Los ejemplos de tales promotores incluyen los obtenidos a partir de los genomas de virus tales como el virus del poliovirus, virus de la viruela aviar, adenovirus, virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y virus de simio 40 (SV40). Ciertas realizaciones pueden emplear un promotor heterólogo de mamífero, tal como el promotor de actina, un promotor de inmunoglobulina, un promotor de choque térmico o un promotor que está asociado con la secuencia nativa del gen de interés. Normalmente, el promotor es compatible con la célula diana, tal como un linfocito B quiescente, un linfocito B activado, una célula B plasmática, una célula B de memoria u otro linfocito diana.

40 Ciertas realizaciones pueden emplear uno o más de los promotores de ARN polimerasa II y III. Se puede encontrar una selección adecuada de promotores de ARN polimerasa III, por ejemplo, en Paule y White. *Nucleic Acids Research*, Vol. 28, págs. 1283-1298, 2000, que se incorpora en el presente documento a modo de referencia en su totalidad. Los promotores de ARN polimerasa II y III también incluyen cualquier fragmento de ADN sintético o modificado por ingeniería genética que pueda dirigir la ARN polimerasa II o III, respectivamente, para transcribir sus secuencias codificantes de ARN cadena abajo. Además, el promotor o los promotores de ARN polimerasa II o III (Pol II o III) utilizados como parte del vector viral pueden ser inducibles. Se puede usar cualquier promotor inducible adecuado de Pol II o III con los métodos descritos en el presente documento. Los promotores ejemplares de Pol II o III incluyen los promotores sensibles a la tetraciclina proporcionados en Ohkawa y Taira, *Human Gene Therapy*, Vol. 11, págs. 577-585, 2000; y Meissner *et al.*, *Nucleic Acids Research*, Vol. 29, págs. 1672-1682, 2001, cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

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

55 Los ejemplos no limitantes de promotores específicos de tejido incluyen el promotor de Ick (véase, por ejemplo, Garvin *et al.*, *Mol. Cell Biol.* 8:3058-3064, 1988; y Takadera *et al.*, *Mol. Cell Biol.* 9:2173-2180, 1989), el promotor de miogenina (Yee *et al.*, *Genes and Development* 7: 1277-1289, 1993), y el thyl (véase, por ejemplo, Gundersen *et al.*, *Gene* 1 13:207-214, 1992).

60 Otros ejemplos de promotores incluyen el promotor de ubiquitina-C, el promotor de la cadena pesada [mu] humana o el promotor de la cadena pesada de Ig (por ejemplo, MH), y el promotor de la cadena ligera [kappa] humana o el promotor de la cadena ligera de Ig (por ejemplo, EEK), que son funcionales en linfocitos B. El promotor MH contiene el promotor de la cadena pesada [mu] humana precedido por el potenciador [iota][Épsilon][mu] flanqueado por regiones de asociación a la matriz, y el promotor EEK contiene el promotor de la cadena ligera [kappa] precedido por un potenciador intrónico ([iota ][Épsilon][kappa]), una región asociada a la matriz y un potenciador 3' (3[Épsilon][kappa]) (véase, por ejemplo, Luo *et al.*, *Blood.* 1 13:1422-1431, 2009, y la solicitud de patente de Estados

Unidos publicada 20100203630). Por consiguiente, ciertas realizaciones pueden emplear uno o más de estos elementos promotores o potenciadores.

5 Como se ha indicado anteriormente, ciertas realizaciones pueden emplear elementos potenciadores, tal como un potenciador interno, para aumentar la expresión del gen de interés. Los potenciadores son elementos de ADN que actúan en cis, generalmente de 10 a 300 pb de longitud, que actúan sobre un promotor para aumentar su transcripción. Ciertas secuencias potenciadoras pueden proceder de genes de mamíferos (por ejemplo, globina, elastasa, albúmina,  $\alpha$ -fetoproteína, insulina), tal como el potenciador [iota][Épsilon][mu], el potenciador intrínico [iota][Épsilon][kappa] y el potenciador 3' [Épsilon][kappa]. También se incluyen potenciadores de un virus eucariota, 10 que incluyen el potenciador de SV40 en el lado posterior del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador del promotor temprano del citomegalovirus, el potenciador del poliovirus en el lado posterior del origen de replicación y potenciadores de adenovirus. Los potenciadores pueden sufrir un proceso de corte y empalme al vector en una posición 5' o 3' con respecto a la secuencia polinucleotídica específica de antígeno, pero se localizan preferentemente en un sitio 5' con respecto al promotor. Los expertos en la materia seleccionarán el potenciador 15 apropiado basándose en el patrón de expresión deseado.

En ciertas realizaciones, los promotores pueden seleccionarse para permitir la expresión inducible del gen. En la técnica se conocen varios sistemas para la expresión inducible, entre los que se incluyen el sistema sensible a tetraciclina y el sistema operador-represor lac. También se contempla que se pueda usar una combinación de 20 promotores para obtener la expresión deseada del gen de interés. El experto en la materia podrá seleccionar un promotor basándose en el patrón de expresión deseado del gen en el organismo y/o la célula diana de interés.

Ciertos vectores virales contienen secuencias de empaquetamiento de acción en cis para promover la incorporación del ARN genómico viral en la partícula viral. Los ejemplos incluyen secuencias psi. Dichas secuencias de acción en 25 cis son conocidas en la técnica. En ciertas realizaciones, los vectores virales descritos en el presente documento pueden expresar dos o más genes, lo cual se puede conseguir, por ejemplo, mediante la incorporación de un promotor interno que está unido operativamente a cada gen separado más allá del primer gen, mediante la incorporación de un elemento que facilite la coexpresión, tal como un elemento de secuencia interna de entrada al ribosoma (IRES) (patente de Estados Unidos N.º 4.937.190, incorporada por referencia) o un elemento 2A, o ambos. 30 Simplemente a modo de ilustración, los elementos IRES o 2A pueden usarse cuando un solo vector comprende secuencias que codifican cada cadena de una molécula de inmunoglobulina con una especificidad deseada. Por ejemplo, la primera región codificante (que codifica la cadena pesada o ligera) puede estar situada inmediatamente cadena abajo del promotor, y la segunda región codificante (que codifica la otra cadena) puede estar localizada cadena abajo de la primera región codificante, estando el elemento IRES o 2A localizado entre la primera y la 35 segunda región codificante, preferentemente inmediatamente antes de la segunda región codificante. En otras realizaciones, se usa un elemento IRES o 2A para coexpresar un gen no relacionado, tal como un gen informador, un marcador de selección o un gen que mejora la función inmunológica. Los ejemplos de secuencias IRES que se pueden usar incluyen, sin limitación, los elementos IRES del virus de la encefalomiелitis (VEMC), virus de la fiebre aftosa (VFA), virus de la encefalomiелitis murina de Theiler (VEMT), rinovirus humano (RVH), coxsackievirus (CSV), poliovirus (POLIO), Virus de la hepatitis A (VHA), Virus de la hepatitis C (VHC) y Pestivirus (por ejemplo, virus del cólera porcino (VCP) y virus de la diarrea viral bovina (VDVB)) (véase, por ejemplo, Le et al., Virus Genes 12:135-40 147, 1996; y Le et al., Nuc. Acids Res. 25:362-369, 1997). Un ejemplo de un elemento 2A incluye la secuencia F2A del virus de la fiebre aftosa.

45 En ciertas realizaciones, los vectores virales proporcionados en el presente documento también pueden contener elementos genéticos adicionales para conseguir un resultado deseado. Por ejemplo, ciertos vectores virales pueden incluir una señal que facilita la entrada nuclear del genoma viral en la célula diana, tal como una señal flap de VIH-1. Como ejemplo adicional, ciertos vectores virales pueden incluir elementos que facilitan la caracterización del sitio de integración del provirus en la célula diana, tal como una secuencia de ARNt supresora de ámbar. Ciertos vectores 50 virales pueden contener uno o más elementos genéticos diseñados para mejorar la expresión del gen de interés. Por ejemplo, se puede poner un elemento sensible al virus de la hepatitis de marmota (VHM) en la construcción (véase, por ejemplo, Zufferey et al., J. Virol. 74:3668-3681, 1999; y Deglon et al., Hum. Gene Then 11:179-190, 2000). Como otro ejemplo, también se puede incluir en la construcción viral un aislante de la [beta]-globina de pollo. Se ha demostrado que este elemento reduce la posibilidad de silenciar el provirus integrado en la célula diana debido a los 55 efectos de metilación y heterocromatinización. Además, el aislante puede proteger al potenciador interno, promotor y gen exógeno de efectos posicionales positivos o negativos del ADN circundante en el sitio de integración en el cromosoma. Ciertas realizaciones emplean cada uno de estos elementos genéticos. En otra realización, los vectores virales proporcionados en el presente documento también pueden contener un elemento de apertura de cromatina ubicuo (UCOE) para aumentar la expresión (véase, por ejemplo, Zhang F, et al., Molecular Therapy: The journal of 60 the American Society of Gene Therapy 2010 Sep; 18(9):1640-9.)

En ciertas realizaciones, los vectores virales (por ejemplo, retrovirales, lentivirales) que se proporcionan en el presente documento están "pseudotipados" con una o más glicoproteínas virales o proteínas de la envoltura seleccionadas, principalmente para dirigirse a tipos celulares seleccionados. La pseudotipificación se refiere 65 generalmente a la incorporación de una o más glicoproteínas virales heterólogas en la partícula del virus de la superficie celular, a menudo permitiendo que la partícula del virus infecte una célula seleccionada que difiere de sus

células diana normales. Un elemento "heterólogo" procede de un virus distinto del virus del que procede el genoma de ARN del vector viral. Normalmente, las regiones codificantes de glicoproteínas del vector viral se han alterado genéticamente, tal como por delección, para evitar la expresión de su propia glicoproteína. Simplemente a modo de ilustración, las glicoproteínas gp41 y/o gp120 de la envoltura de un vector lentiviral derivado de VIH se eliminan normalmente antes de la pseudotipificación con una glicoproteína viral heteróloga.

En ciertas realizaciones, el vector viral se pseudotipifica con una glicoproteína viral heteróloga que se dirige a los linfocitos B. En ciertas realizaciones, la glicoproteína viral permite la infección selectiva o la transducción de linfocitos B en reposo o quiescentes. En ciertas realizaciones, la glicoproteína viral permite la infección selectiva de las células plasmáticas de linfocitos B, plasmablastos y células B activadas. En ciertas realizaciones, la glicoproteína viral permite la infección o transducción de linfocitos B quiescentes, plasmablastos, células plasmáticas y células B activadas. En ciertas realizaciones, la glicoproteína viral permite la infección de las células de leucemia linfocítica crónica de células B. El vector viral se pseudotipifica con VSV-G. Se desvela adicionalmente en el presente documento que la glicoproteína viral heteróloga puede derivar de la glicoproteína del virus del sarampión, tal como el virus del sarampión de Edmonton. En el presente documento se desvela que las glicoproteínas del virus del sarampión hemaglutinina (H), proteína de fusión (F) o ambas pueden pseudotipificarse (véase, por ejemplo, Frecha et al., *Blood*. 1 12:4843-52, 2008; y Frecha et al., *Blood*. 1 14:3173-80, 2009). También se desvela en el presente documento que el vector viral puede pseudotipificarse con el virus de la leucemia del mono gibón (VLG). En realizaciones adicionales, el vector viral comprende un dominio de unión a anticuerpo incorporado, tal como una o más regiones variables (por ejemplo, regiones variables de cadena pesada y ligera) que sirven para dirigir el vector a un tipo celular particular.

La generación de vectores víricos puede lograrse usando cualquier técnica de ingeniería genética adecuada conocida en la técnica, incluyendo, sin limitación, las técnicas estándar de digestión con endonucleasas de restricción, ligamiento, transformación, purificación de plásmidos, amplificación por PCR y secuenciación de ADN, por ejemplo, tal como se describe en Sambrook et al. (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y. (1989)), Coffin et al. (*Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y. (1997)) y "RNA Viruses: A Practical Approach" (Alan J. Cann, Ed., Oxford University Press, (2000)).

Se puede usar cualquier diversidad de métodos conocidos en la técnica para producir partículas retrovirales adecuadas cuyo genoma comprende una copia de ARN del vector viral. Como un método, el vector viral puede introducirse en una línea celular de empaquetamiento que empaqueta el ARN genómico viral basado en el vector viral dentro de partículas virales con una especificidad de células diana deseada. La línea celular de empaquetamiento normalmente proporciona en trans las proteínas virales que se requieren para el empaquetamiento del ARN genómico viral en partículas virales y la infección de la célula diana, incluyendo las proteínas estructurales gag, las proteínas enzimáticas pol y las glicoproteínas de la envoltura.

En ciertas realizaciones, la línea celular de empaquetamiento puede expresar de manera estable ciertas proteínas virales necesarias o deseadas (por ejemplo, gag, pol) (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N.º 6.218.181). En ciertas realizaciones, la línea celular de empaquetamiento puede transfectarse de forma transitoria con plásmidos que codifican ciertas de las proteínas virales necesarias o deseadas (por ejemplo, gag, pol, glicoproteína), incluyendo las secuencias de glicoproteínas del virus del sarampión descritas en el presente documento. En una realización ejemplar, la línea celular de empaquetamiento expresa de manera estable las secuencias gag y pol, y la línea celular se transfecta luego con un plásmido que codifica el vector viral y un plásmido que codifica la glicoproteína. Tras la introducción de los plásmidos deseados, las partículas virales se recogen y procesan en consecuencia, tal como mediante ultracentrifugación para conseguir una reserva concentrada de partículas virales. Las líneas celulares de empaquetamiento ejemplares incluyen las líneas celulares 293 (ATCC CCL X), HeLa (ATCC CCL 2), D17 (ATCC CCL 183), MDCK (ATCC CCL 34), BHK (ATCC CCL-10) y Cf2Th (ATCC CRL 1430).

### **Gen/ácido nucleico de interés**

Como se usa en el presente documento, "gen de interés" o "gen" o "ácido nucleico de interés" se refiere a un ácido nucleico de interés que codifica una proteína de interés a expresar en la célula diana transducida. Aunque se puede usar el término "gen", esto no implica que se trate de un gen como se encuentra en el ADN genómico y se usa indistintamente con el término "ácido nucleico". En general, el ácido nucleico de interés proporciona un ácido nucleico adecuado para codificar la proteína de interés y puede comprender ADNc o ADN y puede incluir o no intrones, pero generalmente no incluye intrones. Como se ha indicado en otra parte, el ácido nucleico de interés está unido operativamente a secuencias de control de la expresión para expresar efectivamente la proteína de interés en la célula diana. En ciertas realizaciones, los vectores descritos en el presente documento pueden comprender dos o más genes de interés, y pueden incluir 2, 3 o 4 genes de interés, tales como, por ejemplo, las cadenas pesadas y ligeras de una inmunoglobulina que pueden organizarse usando un promotor interno como se describe en el presente documento.

El término "polinucleótido" o "ácido nucleico" como se usa en el presente documento indica ARNm, ARN, ARNc, ADNc o ADN. El término normalmente se refiere a la forma polimérica de nucleótidos de al menos 10 bases de

longitud, ya sean ribonucleótidos o desoxinucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. El término incluye formas mono y bicatenarias de ADN y ARN. El ácido nucleico o gen de interés puede ser cualquier ácido nucleico que codifique una proteína de interés. Una proteína de interés para su uso como se describe en el presente documento comprende cualquier proteína que proporcione una actividad deseada. A este respecto, una

5 proteína de interés incluye, pero sin limitación, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, un receptor de la superficie celular, una proteína secretada tal como una citocina (linfocinas, interleucinas, interferones o quimiocinas), una molécula pequeña codificada por ADN (véase, por ejemplo, *Nature Chemical Biology* 5, 647-654 (2009)), o una molécula de adhesión. En una realización, el ácido nucleico codifica un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. Los ejemplos de fragmentos de unión a antígeno incluyen anticuerpos de dominio, sFv,

10 scFv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv). En una realización, el anticuerpo codificado por el ácido nucleico comprende al menos el dominio de unión a antígeno del anticuerpo de neutralización del VIH, b12 (véase, por ejemplo, *J Virol* 2003, 77:5863-5876; *J Virol.* agosto de 1994; 68(8):4821 -8; *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992, 89:9339-9343; Se proporcionan secuencias ejemplares en los números de acceso del GenBank para la cadena ligera (AAB26306.1 GI 299737) y la cadena pesada (AAB26315.1 GI 299746) de b12). En una realización adicional, el anticuerpo codificado por el ácido nucleico de interés comprende Fuzeon(TM) (T-20/enfuvirtida/pentafusida/DP-178). DP-178 es una

15 secuencia de aminoácidos de gp41 de VIH e interfiere con la capacidad del VIH para fusionarse con su célula diana. Fuzeon puede producirse por síntesis usando métodos conocidos por la persona experta (véase, por ejemplo, 2001 *J. Virol.* 75:3038-3042; Cabe señalar que es altamente improbable que los métodos descritos en el presente documento produzcan la secreción de una dosis terapéutica del péptido DP-178).

En una realización particular, el ácido nucleico de interés codifica una proteína inmunológicamente activa. En ciertas realizaciones, un ácido nucleico de interés codifica una proteína, o un fragmento biológicamente activo de la misma, que induce una reacción inmunológica similar a la de una vacuna a través de la presentación de la proteína en la

25 superficie de una célula B, célula T u otra célula inmunológica. En ciertas realizaciones, la proteína de interés influye en la regulación de las células B, por ejemplo, pero sin limitación, en la promoción de la división celular, la promoción de la diferenciación en diferentes linajes B, la inactivación o destrucción de células, o la regulación de la producción o actividad de otros elementos de ADN introducidos. Los expertos conocen las interleucinas y hasta la fecha incluyen IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, forma secretada de la subunidad p28 de IL27, IL-28, IL-29, IL-

30 30, IL-31, IL-32, IL-33, IL-34 e IL-35. Los interferones incluyen IFN-[gamma], IFN-a, IFN- [beta] e IFN-[omega]. Las quimiocinas contempladas para su uso en la presente invención incluyen las quimiocinas de tipo C XCL1 y XCL2, quimiocinas de tipo C-C (que incluyen hasta la fecha CCL1-CCL28) y quimiocinas de tipo CXC (que incluyen hasta la fecha CXCL1-CXCL17). También se contemplan como genes de interés los miembros de la superfamilia TNF (por ejemplo, TNF-a, ligando 4-1 BB, factor de activación de células B, ligando Fas, linfotoxina, OX40L RANKL y TRAIL).

En ciertas realizaciones, la proteína de interés induce tolerancia inmunológica. A este respecto, la proteína de interés puede comprender una proteína de fusión de antígeno-IgG (véase, por ejemplo, *Cellular Immunology* 235 (1), 2005, 12-20).

En una realización adicional, el o los genes de interés codifican uno o más factores que promueven la diferenciación de la célula B en una célula secretora de anticuerpos y/o uno o más factores que promueven la longevidad de la célula productora de anticuerpos. Tales factores incluyen, por ejemplo, Blimp-1, TRF4, factores antiapoptóticos tales como Bcl-xl o Bcl5, mutantes constitutivamente activos del receptor CD40. Otros genes de interés codifican factores que promueven la expresión de moléculas de señalización cadena abajo, tales como factores asociados al receptor de TNF (TRAF). A este respecto, la activación celular, la supervivencia celular y las funciones antiapoptóticas de la

45 superfamilia de receptores de TNF están mediadas principalmente por TRAF 1-6 (véase, por ejemplo, R.H. Arch, et al., *Genes Dev.* 12 (1998), págs. 2821-2830). Los efectores cadena abajo de la señalización TRAF incluyen factores de transcripción en la familia NF-KB y AP-1 que pueden activar a su vez genes involucrados en diversos aspectos de funciones celulares e inmunológicas. Además, se ha demostrado que la activación de NF- [kappa][Beta] y AP-1 proporciona protección celular contra la apoptosis mediante la transcripción de genes antiapoptóticos.

En una realización adicional, el o los ácidos nucleicos de interés codifican una o más proteínas derivadas del virus Epstein Barr (VEB). Las proteínas derivadas de VEB incluyen, pero sin limitación, EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3, LMP-1, LMP-2, EBER, EBV-EA, EBV-MA, EBV-VCA y EBV-AN. En una realización particular, el ácido nucleico de interés

55 codifica un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo. A este respecto, el anticuerpo puede ser un anticuerpo natural o un anticuerpo adaptado, modificado por ingeniería genética recombinante. Se contempla específicamente que los vectores descritos en el presente documento codifican proteínas de fusión que comprenden un anticuerpo o una porción del mismo.

En una realización, un anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con la presente divulgación tiene una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo anti-VIH, tal como el anticuerpo anti-VIH m36 (véase, por ejemplo, *Proc Natl Acad Sci USA.* 4 de noviembre de 2008; 105 (44): 17121 -6), o una molécula de aminoácido que tiene al menos un 60 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo anti-VIH, tal como m36. en particular, se contemplan específicamente proteínas de fusión que comprenden m36, o derivados de las mismas, tales como m36L2CD4Fc (véase, por ejemplo, *Antiviral Research*, volumen 88, Edición 1, octubre de 2010, Páginas 107-1 15).

En una realización adicional, el anticuerpo codificado por el transgén de la divulgación se une a un autoantígeno. En ciertas realizaciones, el autoantígeno a este respecto está asociado con el desarrollo de esclerosis múltiple o diabetes tipo 1, incluyendo, pero sin limitación, MBP, alfaB-cristalina, S100beta, proteína proteolípida (PLP), HSP105, isoforma epitelial del antígeno 1 de penfigoide ampolloso (BP) (BPAG1 -e), lípidos, e isoformas de glicoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG)-alfa y MOG-beta o cualquiera de una diversidad de autoantígenos de células de islotes (por ejemplo, sialoglicolípido, glutamato descarboxilasa, insulina, receptor de insulina, 38 kD, albúmina sérica bovina, transportador de glucosa, hsp 65, carboxipeptidasa H, 52 kD, ICA 12/ICA512, 150 kD y RIN polar). Los anticuerpos para estos autoantígenos son conocidos en la técnica y pueden secuenciarse y fabricarse de manera recombinante utilizando técnicas de rutina (véase, por ejemplo, J. Clin. Invest. 107(5): 555-564 (2001)).

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

En realizaciones adicionales, el ácido nucleico de interés codifica un péptido u otro dominio de unión con un atributo funcional particular, tal como, pero sin limitación, una actividad inhibidora, capacidad de inducir la muerte celular en células cancerosas o capacidad de ralentizar o inhibir la proliferación de células cancerosas. A este respecto, en una realización, un péptido o dominio de unión codificado por el ácido nucleico de interés puede unirse a cualquiera de las proteínas diana descritas en el presente documento, tal como un antígeno asociado a cáncer como se ha descrito anteriormente, CD4, gp120 de VIH u otra proteína viral, ICAM-3, DC-SIGN (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos 7.301.010). En ciertas realizaciones, los péptidos pueden proceder bacterias patógenas y no patógenas y plantas verdes. Se desvelan péptidos ilustrativos en las patentes de Estados Unidos 7084105, 7301010, 7338766, 7381701, 7491394, 7511117, 7556810. En una realización, el ácido nucleico de interés codifica azurina-p28 (NSC745104), un inhibidor peptídico de la ubiquitinación de p53 (véase, por ejemplo, Cancer Chemother Pharmacol 2010, DOI 10.1007/S00280-010-1518-3; Patente de Estados Unidos 7.084.105). En una realización adicional, el ácido nucleico de interés codifica un factor conocido como Grelina, que induce el apetito y puede usarse para tratar pacientes con cáncer (véase, por ejemplo, Obes Facts. 2010 3:285-92; FASEB J. 18 (3): 439-56). En otra realización, el ácido nucleico de interés codifica un péptido de unión que se une e inhibe la angiotensina 1 y 2 (véase, por ejemplo, AMG386, un fragmento Fc de un anticuerpo (pepticuerpo) usado para tratar el cáncer; En ciertas realizaciones, los antígenos tumorales pueden identificarse directamente en un individuo con cáncer. A este respecto, las selecciones se pueden llevar a cabo utilizando una diversidad de tecnologías conocidas. Por ejemplo, en una realización, se toma una biopsia tumoral de un paciente, se aísla el ARN a partir de las células tumorales y se selecciona usando un chip genético (por ejemplo, de Affymetrix, Santa Clara, CA) y se identifica un antígeno tumoral. Una vez que se ha identificado el antígeno diana del tumor, puede clonarse, expresarse y purificarse usando técnicas conocidas en este campo.

En una realización, el ácido nucleico de interés codifica la iduronidasa (IDUA) para el tratamiento o prevención de la mucopolisacaridosis tipo I (MPS I o síndrome de Hurler). En otra realización, el ácido nucleico de interés codifica el factor VII para el tratamiento o prevención de la hemofilia. En una realización, el ácido nucleico de interés codifica la lecitina-colesterol aciltransferasa (LCAT) útil para el tratamiento o prevención de, por ejemplo, la deficiencia de LCAT y la aterosclerosis. En otra realización, el ácido nucleico de interés codifica la apolipoproteína A-1 Milano (ApoA-1 Milano) para el tratamiento o prevención de enfermedades y trastornos cardiovasculares, tales como, por ejemplo, aterosclerosis. En una realización, el ácido nucleico de interés codifica lipoproteína lipasa (LPL) para el tratamiento o prevención de la deficiencia de LPL. En otra realización, el ácido nucleico de interés codifica un anticuerpo ampliamente neutralizante (bNAb), o una proteína de fusión del mismo, que se une a y neutraliza múltiples cepas de VIH-1 (por ejemplo, b12). En otra realización más, el ácido nucleico de interés codifica la fenilalanina hidroxilasa para el tratamiento o la prevención de la fenilcetonuria (PKU).

Un "anticuerpo", tal y como se usa en el presente documento, incluye anticuerpos tanto policlonales como monoclonales; primatizados (por ejemplo, humanizados); murinos; de ratón-humano; de ratón-primate; y quiméricos; y pueden ser una molécula intacta, un fragmento de la misma (tal como fragmentos scFv, Fv, Fd, Fab, Fab' y F(ab)2), o multímeros o agregados de moléculas y/o fragmentos intactos; y pueden existir en la naturaleza o pueden producirse, por ejemplo, por inmunización, síntesis o ingeniería genética; un "fragmento de anticuerpo", tal y como se usa en el presente documento, se refiere a fragmentos, derivados o relacionados con un anticuerpo, que se unen al antígeno y que, en algunas realizaciones, pueden modificarse para presentar características estructurales que faciliten la eliminación y la captación, por ejemplo, mediante la incorporación de restos de galactosa. Estos incluyen, por ejemplo, F(ab), F(ab)2, scFv, región variable de la cadena ligera (VL), región variable de la cadena pesada (VH)

y sus combinaciones. Las fuentes incluyen secuencias de genes de anticuerpos de diversas especies (que pueden formatearse como anticuerpos, sFvs, scFvs o Fabs, tal como en una biblioteca de fagos), entre las que se incluyen el ser humano, camélidos (de camellos, dromedarios o llamas; Hamers-Casterman et al. (1993) *Nature*, 363:446 y Nguyen et al. (1998) *J. Mol. Biol.*, 275:413), tiburón (Roux et al. (1998) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. (Estados Unidos)* 95: 1804), peces (Nguyen et al. (2002) *Immunogenetics*, 54:39), roedores, aves, ovinos, secuencias que codifican bibliotecas de péptidos aleatorias o secuencias que codifican una diversidad de aminoácidos modificados por ingeniería genética en regiones de bucle de soportes alternativos sin anticuerpos, tales como dominios de fibrinógeno (véase, por ejemplo, Weisel et al. (1985) *Science* 230:1388), Dominios de Kunitz (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N.º 6.423.498), dominios de lipocalina (véase, por ejemplo, el documento WO 2006/095164), dominios tipo V (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N.º 2007/0065431), Dominios de lectina de tipo C (Zelensky y Gready (2005) *FEBS J.* 272: 6179), mAb<2> o Fcab(TM) (véanse, por ejemplo, las publicaciones de solicitud de patente PCT N.º WO 2007/098934; WO 2006/072620), o similares.

Los términos entendidos por los expertos en la materia como referentes a la tecnología de anticuerpos reciben, cada uno, el significado adquirido en la técnica, a menos que se defina expresamente en el presente documento. Por ejemplo, los términos "VL" y "VH" se refieren a la región de unión variable derivada de una cadena ligera y pesada de anticuerpo, respectivamente. Las regiones de unión variables están formadas por subregiones discretas y bien definidas conocidas como "regiones determinantes de complementariedad" (CDR) y "regiones marco" (FR). Los términos "O" y "CH" se refieren a una "región constante de inmunoglobulina" es decir, una región constante derivada de una cadena ligera o pesada de anticuerpo, respectivamente, entendiéndose que la última región puede dividirse adicionalmente en dominios de región constante Cm, CH2, CH3 y CH4, dependiendo del isotipo del anticuerpo (IgA, IgD, IgE, IgG, IgM) del que procede la región. Una porción de los dominios de la región constante constituye la región Fe (la región "fragmento cristalizante"), que contiene dominios responsables de las funciones efectoras de una inmunoglobulina, tales como ADCC (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos), CDC (citotoxicidad dependiente del complemento) y fijación del complemento, unión a receptores de Fe, mayor vida media *in vivo* con respecto a un polipéptido que carece de una región Fe, unión a proteína A y, tal vez, incluso transferencia placentaria (véase Capon et al. (1989) *Nature*, 337:525). Además, un polipéptido que contiene una región Fe permite la dimerización o multimerización del polipéptido.

La estructura de dominio de las inmunoglobulinas es susceptible de modificación por ingeniería genética, en el sentido de que los dominios de unión a antígeno y los dominios que confieren funciones efectoras pueden intercambiarse entre clases y subclases de inmunoglobulina. Se revisan la estructura y la función de la inmunoglobulina, por ejemplo, en Harlow et al., Eds., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Capítulo 14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1988). Se puede encontrar una amplia introducción, así como información detallada sobre todos los aspectos de la tecnología de anticuerpos recombinantes en el libro de texto *Recombinant Antibodies* (John Wiley & Sons, NY, 1999). Se puede encontrar una colección completa de protocolos detallados de laboratorio de ingeniería de anticuerpos en R. Kontermann y S. Dubel, Eds., *The Antibody Engineering Lab Manual* (Springer Verlag, Heidelberg/Nueva York, 2000). También están disponibles otros protocolos relacionados en *Current Protocols in Immunology* (agosto de 2009), publicado por John Wiley & Sons, Inc., Boston, MA. También se conocen en la técnica métodos para la producción de enzimas y la modificación de proteínas por ingeniería genética (por ejemplo, IDUA) y se contemplan para su uso en la presente invención.

Por lo tanto, esta divulgación proporciona polinucleótidos (polinucleótidos aislados o purificados o puros) que codifican las proteínas de interés de esta divulgación para modificar genéticamente células B, vectores (incluyendo vectores de clonación y vectores de expresión) que comprenden dichos polinucleótidos, y células (por ejemplo, células hospedadoras) transformadas o transfectadas con un polinucleótido o vector de acuerdo con esta divulgación. En ciertas realizaciones, se contempla un polinucleótido (ADN o ARN) que codifica una proteína de interés de esta divulgación. También se contemplan en el presente documento Los casetes de expresión que codifican proteínas de interés.

La presente divulgación también se refiere a vectores que incluyen un polinucleótido de esta divulgación y, en particular, a construcciones de expresión recombinante. En una realización, esta divulgación contempla un vector que comprende un polinucleótido que codifica una proteína de esta divulgación, junto con otras secuencias polinucleotídicas que causan o facilitan la transcripción, traducción y procesamiento de tales secuencias que codifican proteínas. Se describen vectores de clonación y expresión apropiados para su uso con hospedadores procariontes y eucariotas, por ejemplo, en Sambrook et al, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición, Cold Spring Harbor, NY, (1989). Los ejemplos de vectores de clonación/expresión incluyen vectores de clonación, vectores lanzadera y construcciones de expresión, que pueden estar basadas en plásmidos, fagémidos, fásmidos, cósmidos, virus, cromosomas artificiales o cualquier vehículo de ácido nucleico conocido en la técnica adecuado para amplificación, transferencia y/o expresión de un polinucleótido contenido en el mismo.

Como se usa en el presente documento, a menos que se describa lo contrario con respecto a los vectores virales, "vector" significa una molécula de ácido nucleico que puede transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Los vectores ejemplares incluyen plásmidos, cromosomas artificiales de levadura y genomas virales. Ciertos vectores pueden replicarse de forma autónoma en una célula hospedadora, mientras que otros vectores se pueden integrar

en el genoma de una célula hospedadora y, por lo tanto, se replican con el genoma del hospedador. Además, ciertos vectores se denominan en el presente documento "vectores de expresión recombinantes" (o, simplemente, "vectores de expresión"), que contienen secuencias de ácido nucleico que están unidas operativamente a una secuencia de control de la expresión y, por lo tanto, son capaces de dirigir la expresión de esas secuencias. En ciertas realizaciones, las construcciones de expresión derivan de vectores plasmídicos. Las construcciones ilustrativas incluyen el vector pNASS modificado (Clontech, Palo Alto, CA), que tiene secuencias de ácido nucleico que codifican un gen de resistencia a ampicilina, una señal de poliadenilación y un sitio promotor de T7; pDEF38 y pNEF38 (CMC ICOS Biologies, Inc.), que tienen un promotor de CHEF1; y pD18 (Lonza), que tiene un promotor de CMV. Se conocen bien otros vectores de expresión de mamíferos adecuados (véase, por ejemplo, Ausubel et al., 1995; Sambrook et al., citado anteriormente; véanse también, por ejemplo, catálogos de Invitrogen, San Diego, CA; Novagen, Madison, WI; Pharmacia, Piscataway, NJ). Se pueden preparar construcciones útiles que incluyen una secuencia codificante de la dihidrofolato reductasa (DHFR) bajo control regulador adecuado, para promover mayores niveles de producción de las proteínas de fusión, siendo el resultado tales niveles de la amplificación de genes después de la aplicación de un agente de selección apropiado (por ejemplo, metotrexato).

En general, los vectores de expresión recombinantes incluirán orígenes de replicación y marcadores de selección que permiten la transformación de la célula hospedadora, y un promotor derivado de un gen altamente expresado para dirigir la transcripción de una secuencia estructural cadena abajo, como se ha descrito anteriormente. Un vector en unión operativa con un polinucleótido de acuerdo con esta divulgación produce una construcción de clonación o expresión. Las construcciones ejemplares de clonación/expresión contienen al menos un elemento de control de la expresión, por ejemplo, un promotor, unido operativamente a un polinucleótido de esta divulgación. También se contemplan en los vectores y las construcciones de clonación/expresión de acuerdo con esta divulgación elementos de control de la expresión adicionales, tales como potenciadores, sitios de unión específicos de factor, terminadores y sitios de unión a ribosomas. La secuencia estructural heteróloga del polinucleótido de acuerdo con esta divulgación se ensambla en una fase apropiada con secuencias de iniciación y terminación de la traducción. Por lo tanto, por ejemplo, los ácidos nucleicos codificantes proporcionados en el presente documento pueden incluirse en una cualquiera de una diversidad de construcciones de vectores de expresión como una construcción de expresión recombinante para expresar dicha proteína en una célula hospedadora.

La secuencia o secuencias de ADN apropiadas pueden insertarse en un vector, por ejemplo, por una diversidad de procedimientos. En general, se inserta una secuencia de ADN en un sitio o sitios de escisión por endonucleasa de restricción apropiados mediante procedimientos conocidos en la técnica. Se contemplan técnicas estándar para la clonación, aislamiento de ADN, amplificación y purificación, para reacciones enzimáticas en las que están implicadas la ADN ligasa, ADN polimerasa, endonucleasas de restricción y similares, y diversas técnicas de separación. Se describen varias técnicas estándar, por ejemplo, en Ausubel et al. (Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publ. Assoc. Inc. & John Wiley & Sons, Inc., Boston, MA, 1993); Sambrook et al. (Molecular Cloning, segunda ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY, 1989); Maniatis et al. (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, NY, 1982); Glover (Ed.) (DNA Cloning Vol. I y II, IRL Press, Oxford, UK, 1985); Hames y Higgins (Eds.) (Nucleic Acid Hybridization, IRL Press, Oxford, UK, 1985); y en otras partes del presente documento.

La secuencia de ADN en el vector de expresión está unida operativamente a al menos una secuencia de control de la expresión apropiada (por ejemplo, un promotor constitutivo o un promotor regulado) para dirigir la síntesis de ARNm. Los ejemplos representativos de tales secuencias de control de la expresión incluyen promotores de células eucariotas o sus virus, como se ha descrito anteriormente. Las regiones promotoras pueden seleccionarse de cualquier gen deseado usando vectores CAT (cloranfenicol transferasa) u otros vectores con marcadores de selección. Los promotores eucariotas incluyen el promotor temprano inmediato de CMV, timidina quinasa de VHS, promotor temprano y tardío de SV40, LTR de retrovirus y metalotioneína-I de ratón. La selección del vector y promotor apropiados está dentro del nivel de experiencia habitual en la técnica, y la preparación de ciertas construcciones de expresión recombinante particularmente preferidas que comprenden al menos un promotor o promotor regulado unido operativamente a un ácido nucleico que codifica una proteína o polipéptido de acuerdo con esta divulgación se describe en el presente documento.

También se contemplan variantes de los polinucleótidos de esta divulgación. Los polinucleótidos variantes son al menos un 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, y preferentemente un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 99,9 % idénticos a uno de los polinucleótidos de secuencia definida descritos en el presente documento, o que hibridan con uno de esos polinucleótidos de secuencia definida en condiciones de hibridación rigurosas de cloruro de sodio 0,015 M, citrato de sodio 0,0015 M a aproximadamente 65-68 ° C o cloruro de sodio 0,015 M, citrato de sodio 0,0015 M y formamida al 50 % a aproximadamente 42 ° C. Las variantes de polinucleótidos conservan la capacidad de codificar un dominio de unión o proteína de fusión del mismo que tiene la funcionalidad descrita en el presente documento.

El término "riguroso" se usa para referirse a condiciones que comúnmente se entienden en la técnica como rigurosas. La rigurosidad de la hibridación se determina principalmente por la temperatura, la fuerza iónica y la concentración de agentes desnaturizantes tales como formamida. Son ejemplos de condiciones rigurosas para hibridación y lavado cloruro de sodio 0,015 M, citrato de sodio 0,0015 M a aproximadamente 65-68 ° C o cloruro de sodio 0,015 M, citrato de sodio 0,0015 M y formamida al 50 % a aproximadamente 42 ° C (véase Sambrook et al.,

Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989). También pueden usarse condiciones más rigurosas (tales como mayor temperatura, menor fuerza iónica, mayor concentración de formamida u otro agente desnaturizante); sin embargo, se verá afectada la tasa de hibridación. En lo que respecta a la hibridación de desoxiligonucleótidos, otras condiciones de hibridación rigurosas ejemplares incluyen lavado en SSC 6x, pirofosfato de sodio al 0,05 % a 37 ° C (para oligonucleótidos de 14 bases), 48 ° C (para oligonucleótidos de 17 bases), 55 ° C (para oligonucleótidos de 20 bases) y 60 ° C (para oligonucleótidos de 23 bases).

Otro aspecto de esta divulgación proporciona una célula hospedadora transformada o transfectada con, o que contiene de otro modo, cualquiera de los polinucleótidos o construcciones de vector/expresión de esta divulgación. Los polinucleótidos o las construcciones de clonación/expresión de esta divulgación se introducen en células adecuadas usando cualquier método conocido en la técnica, entre los que se incluyen transformación, transfección y transducción. Las células hospedadoras incluyen las células de un sujeto sometido a terapia celular *ex vivo* que incluye, por ejemplo, terapia de genes *ex vivo*. Las células hospedadoras eucariotas contempladas como un aspecto de esta divulgación, cuando albergan un polinucleótido, vector o proteína de acuerdo con esta divulgación incluyen, además de las propias células de un sujeto (por ejemplo, las propias células de un paciente humano), células VERO, células HeLa, líneas celulares de ovario de hámster chino (CHO) (incluidas las células CHO modificadas capaces de modificar el patrón de glicosilación de moléculas de unión multivalentes expresadas, véase la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos N.º 2003/01 15614), células COS (tales como COS-7), W138, BHK, HepG2, 3T3, RIN, MDCK, A549, PC12, K562, células HEK293, células HepG2, células N, células 3T3, células de *Spodoptera frugiperda* (por ejemplo, células Sf9), células de *Saccharomyces cerevisiae* y cualquier otra célula eucariota conocida en la técnica que sea útil para expresar, y opcionalmente aislar, una proteína o péptido de acuerdo con esta divulgación. También se contemplan células procariotas, incluyendo *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, un estreptomiceto, o cualquier célula procariota conocida en la técnica que sea adecuada para expresar, y opcionalmente aislar, una proteína o péptido de acuerdo con esta divulgación. En el aislamiento de proteínas o péptidos a partir de células procariotas, en particular, se contempla que se pueden usar técnicas conocidas en este campo para extraer proteínas a partir de cuerpos de inclusión. La selección de un hospedador apropiado está dentro del alcance de los expertos en la materia a partir de las enseñanzas del presente documento. Se contemplan células hospedadoras que glicosilan las proteínas de fusión de esta divulgación.

La expresión "célula hospedadora recombinante" (o simplemente "célula hospedadora") se refiere a una célula que contiene un vector de expresión recombinante. Debe entenderse que dichos términos pretenden hacer referencia no solo a la célula concreta, sino también a la descendencia de dicha célula. Debido a que pueden producirse determinadas mutaciones en generaciones posteriores debido a una mutación o a influencias ambientales, dicha descendencia puede, de hecho, no ser idéntica a la célula parental, pero aun así se incluyen dentro del alcance de la expresión "célula hospedadora", tal como se usa en el presente documento. Las células hospedadoras recombinantes pueden cultivarse en un medio nutriente convencional modificado según sea apropiado para activar promotores, seleccionar transformantes o amplificar genes particulares. Las condiciones de cultivo para células hospedadoras particulares seleccionadas para la expresión, tales como la temperatura, el pH y similares, serán evidentes fácilmente para el experto en la materia. También se pueden emplear diversos sistemas de cultivo de células de mamíferos para expresar proteínas recombinantes. Los ejemplos de sistemas de expresión de mamíferos incluyen las líneas COS-7 de fibroblastos de riñón de mono, descritas por Gluzman (1981) Cell 23:175, y otras líneas celulares capaces de expresar un vector compatible, por ejemplo, las líneas celulares C127, 3T3, CHO, HeLa y BHK. Los vectores de expresión de mamíferos comprenderán un origen de replicación, un promotor adecuado y, opcionalmente, potenciador, y también cualquier sitio de unión al ribosoma necesario, sitio de poliadenilación, sitio donador y aceptor de corte y empalme, secuencias de terminación de la transcripción y secuencias flanqueantes 5' no transcritas, por ejemplo, como se describe en el presente documento con respecto a la preparación de construcciones de expresión de proteínas de unión multivalentes. Las secuencias de ADN derivadas del corte y empalme de SV40 y los sitios de poliadenilación pueden usarse para proporcionar los elementos genéticos no transcritos requeridos. La introducción de la construcción en la célula hospedadora puede realizarse mediante una diversidad de métodos con los que los expertos en la materia estarán familiarizados, entre los que se incluyen la transfección con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-Dextrano o electroporación (Davis et al. (1986) Basic Methods in Molecular Biology).

## 55 Composiciones y métodos de uso

Además, las composiciones de células de la presente divulgación comprenden células B que se han activado/diferenciado *in vitro* y transducido para expresar una proteína de interés como se describe en el presente documento. Las composiciones pueden comprender células B que se han diferenciado en células B plasmáticas, se han transducido y expresan una o más proteínas de interés. Las poblaciones de células diana, tales como las poblaciones de células B transducidas y activadas de la presente divulgación pueden administrarse solas o como una composición farmacéutica en combinación con diluyentes y/o con otros componentes tales como citocinas o poblaciones de células. En resumen, las composiciones de células de la presente divulgación pueden comprender una población de células B diferenciadas y activadas que se ha transducido y está expresando una proteína de interés como se describe en el presente documento, en combinación con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéutica o fisiológicamente aceptables. Dichas composiciones pueden comprender tampones tales

como solución salina tamponada neutra, solución salina tamponada con fosfato y similares; carbohidratos tales como glucosa, manosa, sacarosa o dextranos, manitol; proteínas; polipéptidos o aminoácidos tales como glicina; antioxidantes; agentes quelantes tales como EDTA o glutatión; adyuvantes (por ejemplo, hidróxido de aluminio); y conservantes. Las composiciones de la presente divulgación se formulan preferentemente para administración intravenosa.

Las composiciones de células de la presente divulgación pueden administrarse de una manera apropiada para la enfermedad a tratar (o prevenir). La cantidad y la frecuencia de la administración estarán determinadas por factores tales como el estado del paciente y el tipo y la gravedad de la enfermedad del paciente, aunque las dosis apropiadas pueden determinarse mediante ensayos clínicos.

Cuando se indica "una cantidad eficaz", "una cantidad antitumoral eficaz", "una cantidad inhibidora de tumores eficaz" o "cantidad terapéutica", la cantidad precisa de las composiciones de la presente divulgación a administrar puede determinarse por un médico teniendo en cuenta las diferencias individuales de edad, peso, tamaño del tumor, grado de infección o metástasis, y el estado del paciente (sujeto). Las composiciones de células B también se pueden administrar varias veces a una o más dosis apropiadas. Las células pueden administrarse utilizando técnicas de infusión que se conocen comúnmente en inmunoterapia (véase, por ejemplo, Rosenberg et al., *New Eng. J. of Med.* 319:1676, 1988). La dosis y el régimen de tratamiento óptimos para un paciente particular pueden determinarse fácilmente por un experto en la materia de la medicina mediante la supervisión en el paciente de signos de enfermedad y el ajuste del tratamiento de acuerdo con esto. Normalmente, en estudios relacionados de inmunoterapia adoptiva, las células T específicas de antígeno se administran al paciente en una cantidad de aproximadamente  $2 \times 10^9$  a  $2 \times 10^{11}$  células. (Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N.º 5.057.423). En algunos aspectos de la presente divulgación, pueden administrarse números menores de las células B transducidas de la presente divulgación, en el intervalo de  $10^6$ /kilogramo ( $10^6$ - $10^{11}$  por paciente). En ciertas realizaciones, las células B se administran al sujeto en una cantidad de  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^{10}$ ,  $2 \times 10^{10}$ ,  $1 \times 10^{11}$ ,  $5 \times 10^{11}$  o  $1 \times 10^{12}$  células. Las composiciones de células B pueden administrarse múltiples veces a dosis dentro de estos intervalos. Las células pueden ser autólogas o heterólogas para el paciente sometido a terapia. Si se desea, el tratamiento también puede incluir la administración de mitógenos (por ejemplo, PHA) o linfocinas, citocinas y/o quimiocinas (por ejemplo, GM-CSF, IL-4, IL-13, Flt3-L, RANTES, MIP1 a, etc.) como se describe en el presente documento para mejorar la inducción de una respuesta inmunológica.

La administración de las composiciones objeto puede llevarse a cabo de cualquier manera conveniente, entre las que se incluyen inhalación de aerosol, inyección, ingestión, transfusión, implante o trasplante. Las composiciones descritas en el presente documento pueden administrarse a un paciente por vía subcutánea, intradérmica, intratumoral, intraganglionar, intramedular, intramuscular, por inyección intravenosa (i.v.) o por vía intraperitoneal. En una realización, las composiciones de células B de la presente divulgación se administran a un paciente mediante inyección intradérmica o subcutánea. En otra realización, las composiciones de células B como se describen en el presente documento se administran preferentemente mediante inyección i.v. Las composiciones de células B pueden inyectarse directamente en un tumor, ganglio linfático, médula ósea o sitio de infección.

La composición farmacéutica, como se desvela en el presente documento, se puede administrar en un sistema de liberación controlada. En una realización, se puede usar una bomba (véase Langer, 1990, *Science* 249:1527-1533; Sefton 1987, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:201; Buchwald et al., 1980, *Surgery* 88:507; Saudek et al., 1989, *N. Engl. J. Med.* 321:574). En otra realización, pueden usarse materiales poliméricos (véase *Medical Applications of Controlled Release*, 1974, Langer y Wise (eds.), CRC Pres., Boca Ratón, Fla.; *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, 1984, Smolen y Ball (eds.), Wiley, Nueva York; Ranger y Peppas, 1983; *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61; véase también Levy et al., 1985, *Science* 228:190; During et al., 1989, *Ann. Neurol.* 25:351; Howard et al., 1989, *J. Neurosurg.* 71:105). En otra realización más, se puede colocar un sistema de liberación controlada en las proximidades de la diana terapéutica, siendo necesaria, por tanto, solo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, *Medical Applications of Controlled Release*, 1984, Langer y Wise (eds.), CRC Pres., Boca Ratón, Fla., vol. 2, págs. 115-138).

Las composiciones de células B de la presente divulgación también se pueden administrar usando cualquier número de matrices. Las matrices se han utilizado durante varios años dentro del contexto de la modificación de tejidos por ingeniería genética (véase, por ejemplo, *Principles of Tissue Engineering* (Lanza, Langer y Chick (eds.)), 1997. La presente divulgación utiliza tales matrices dentro del nuevo contexto de actuar como un órgano linfoide artificial para ayudar y mantener las células B. Por consiguiente, la presente divulgación puede utilizar las composiciones y formulaciones de matriz que han demostrado utilidad en la modificación de tejidos por ingeniería genética. Por consiguiente, el tipo de matriz que puede usarse en las composiciones, dispositivos y métodos de la divulgación son prácticamente ilimitados y pueden incluir matrices tanto biológicas como sintéticas. En un ejemplo concreto, se utilizan las composiciones y dispositivos establecidos en las patentes de Estados Unidos N.º: 5.980.889; 5.913.998; 5.902.745; 5.843.069; 5.787.900; o 5.626.561. Las matrices comprenden características comúnmente asociadas con ser biocompatibles cuando se administran a un hospedador mamífero. Las matrices pueden formarse a partir de materiales naturales o sintéticos. Las matrices pueden ser no biodegradables en los casos en que es deseable dejar estructuras permanentes o estructuras retirables en el cuerpo de un animal, tales como un implante; o

biodegradable. Las matrices pueden adoptar la forma de esponjas, implantes, tubos, apósitos Telfa, fibras, fibras huecas, componentes liofilizados, geles, polvos, composiciones porosas o nanopartículas. Además, las matrices pueden diseñarse para permitir la liberación sostenida de células sembradas o de la citocina u otro agente activo producido. En ciertas realizaciones, la matriz de la presente divulgación es flexible y elástica, y puede describirse como un armazón semisólido que es permeable a sustancias tales como sales inorgánicas, fluidos acuosos y agentes gaseosos disueltos, incluido el oxígeno.

Una matriz se usa en el presente documento como un ejemplo de una sustancia biocompatible. Sin embargo, la presente divulgación no se limita a las matrices y, por lo tanto, siempre que aparezcan los términos matriz o matrices, estos términos deben interpretarse de manera que incluyan dispositivos y otras sustancias que permiten la retención celular o el desplazamiento celular, que son biocompatibles y pueden permitir el desplazamiento de macromoléculas directamente a través de la sustancia, de manera que la propia sustancia es una membrana semipermeable o se usa junto con una sustancia semipermeable particular.

En ciertas realizaciones de la presente divulgación, Las células B transducidas y activadas usando los métodos descritos en el presente documento, u otros métodos conocidos en la técnica, se administran a un paciente junto con (por ejemplo, antes, simultáneamente o después de) cualquier cantidad de modalidades de tratamiento relevantes, entre las que se incluyen, aunque sin limitación, el tratamiento con agentes tales como agentes antivirales, quimioterapia, radiación, agentes inmunosupresores, tales como ciclosporina, azatioprina, metotrexato, micofenolato y FK506, anticuerpos u otros agentes inmunosupresores tales como CAMPATH, anticuerpos anti-CD3 u otras terapias de anticuerpos, citoxina, fludarabina, ciclosporina, FK506, rapamicina, ácido micofenólico, esteroides, FR901228, citocinas e irradiación. Estos fármacos inhiben la fosfatasa calcineurina dependiente de calcio (ciclosporina y FK506) o inhiben la p70S6 quinasa, que es importante para la señalización inducida por factores de crecimiento (rapamicina). (Liu et al., Cell 66:807-815, 1991; Henderson et al., Immun. 73:316-321, 1991; Bierer et al., Curr. Opin. Immun. 5:763-773, 1993; Isoniemi (supra)). En una realización adicional, las composiciones de células de la presente divulgación se administran a un paciente junto con (por ejemplo, antes, simultáneamente o después de) el trasplante de médula ósea, o terapia ablativa de células T utilizando agentes de quimioterapia tales como, fludarabina, radioterapia de haz externo (XRT), ciclofosfamida o anticuerpos, tales como OKT3 o CAMPATH. En una realización, las composiciones de células de la presente divulgación se administran después de una terapia ablativa de células B, tal como agentes que reaccionan con CD20, por ejemplo, Rituxan(R). Por ejemplo, en una realización, los sujetos pueden someterse a un tratamiento estándar con dosis altas de quimioterapia seguida de trasplante de células madre de sangre periférica. En ciertas realizaciones, después del trasplante, los sujetos reciben una infusión de las células inmunológicas expandidas de la presente divulgación. En una realización adicional, las células expandidas se administran antes o después de la cirugía.

La dosis de los tratamientos anteriores que se administrarán a un paciente variará con la naturaleza precisa de la afección que se esté tratando y el receptor del tratamiento. El aumento a escala de las dosis para la administración a seres humanos se puede realizar de acuerdo con prácticas aceptadas en la técnica.

Las composiciones de células B transducidas de la divulgación, particularmente células B transducidas para expresar un anticuerpo particular de interés, pueden usarse en el tratamiento o prevención de diversas enfermedades infecciosas, cánceres, enfermedades degenerativas y trastornos inmunológicos.

Las composiciones que comprenden las células B transducidas como se describe en el presente documento pueden usarse en el tratamiento de cualquiera de una diversidad de enfermedades infecciosas causadas por organismos infecciosos, tales como virus, bacterias, parásitos y hongos. Los organismos infecciosos pueden comprender virus, (por ejemplo, virus de ARN, virus de ADN, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la hepatitis A, B y C, virus del herpes simple (VHS), citomegalovirus (CMV), virus Epstein-Barr (VEB), virus del papiloma humano (VPH)), parásitos (por ejemplo, patógenos protozoarios y metazoarios tales como especies de Plasmodia, especies de Leishmania, especies de Schistosoma, especies de Trypanosoma), bacterias (por ejemplo, micobacterias, en particular, M. tuberculosis, Salmonella, estreptococos, E. coli, estafilococos), hongos (por ejemplo, especies de Candida, especies de Aspergillus), Pneumocystis carinii y priones (ciertos priones conocidos infectan a los animales para causar tembladera, una enfermedad degenerativa transmisible del sistema nervioso de ovejas y cabras, así como la encefalopatía espongiiforme bovina (EEB), o "enfermedad de las vacas locas", y la encefalopatía espongiiforme felina de los gatos. Cuatro enfermedades por priones que se sabe que afectan a los seres humanos son (1) kuru, (2) enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ), (3) enfermedad de Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS) y (4) insomnio familiar fatal (IFF). Como se usa en el presente documento, "prión" incluye todas las formas de priones que causan todas y cada una de estas enfermedades u otras en cualquier animal usado y, en particular, en seres humanos y animales de granja domesticados. Las enfermedades infecciosas ilustrativas incluyen, pero sin limitación, toxoplasmosis, histoplasmosis, CMV, VEB, coccidiomicosis, tuberculosis, VIH y similares.

En ciertas realizaciones, las composiciones de células B transducidas como se describe en el presente documento también pueden usarse para la prevención o el tratamiento de una diversidad de cánceres. A este respecto, en ciertas realizaciones, las composiciones que comprenden células B transducidas son útiles para prevenir o tratar el melanoma, linfoma no Hodgkin, enfermedad de Hodgkin, leucemia, plasmocitoma, sarcoma, glioma, timoma, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de riñón, carcinoma de células renales, cáncer de útero,

cáncer de páncreas, cáncer de esófago, cáncer cerebral, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer de testículo, cáncer gástrico, cáncer de esófago, mieloma múltiple, hepatoma, leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia mielógena aguda (LMA), leucemia mielógena crónica (LMC) y leucemia linfocítica crónica (LLC) u otros tipos de cáncer.

5 En una realización, las células B transducidas también pueden usarse en el tratamiento de trastornos inmunológicos tales como el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), agammaglobulinemia, hipogammaglobulinemia, otras inmunodeficiencias, inmunosupresión y enfermedad de inmunodeficiencia combinada grave (IDCG).

10 En una realización, las células B transducidas como se describe en el presente documento también pueden usarse en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias tales como, pero sin limitación, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, diabetes dependiente de insulina, enfermedad de Addison, enfermedad celíaca, síndrome de fatiga crónica, enfermedad inflamatoria del intestino, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, fibromialgia, lupus eritematoso sistémico, psoriasis, síndrome de Sjögren, hipertiroidismo/enfermedad de Graves, hipotiroidismo/enfermedad de Hashimoto, diabetes insulino dependiente (tipo 1), miastenia grave, endometriosis, esclerodermia, anemia perniciosa, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Wegener, glomerulonefritis, anemia aplásica, hemoglobinuria paroxística nocturna, síndrome mielodisplásico, púrpura trombocitopénica idiopática, anemia hemolítica autoinmunitaria, síndrome de Evan, síndrome del inhibidor del factor VIII, vasculitis sistémica, dermatomiositis, polimiositis y fiebre reumática. Por lo tanto, en una realización, los métodos del presente documento incluyen métodos para tratar una enfermedad que comprenden administrar a un sujeto o paciente que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de las composiciones que comprenden las células B transducidas como se describe en el presente documento, tratándose así la enfermedad.

## Ejemplos

### 25 Ejemplo 1

#### Diferenciación y transducción *in vitro* de células B de memoria con VSV-G

#### 30 LENTIVIRUS PSEUDOTIPADO

Este ejemplo describe la diferenciación *in vitro* de plasmablastos y células plasmáticas y la transducción de los mismos con el virus VSV-G. Los métodos de la presente invención demuestran que después de la segunda fase del sistema de cultivo, se observa aproximadamente un 20 % de transducción en comparación con solo el 5 % observado usando métodos conocidos en la técnica.

(Para la transducción: Sin inoculación por centrifugación, simplemente añadir al sobrenadante viral sulfato de protamina e incubar durante una noche, cambiar el medio)

40 Las células B de memoria se aislaron usando el protocolo de aislamiento de células B de memoria descrito a continuación.

1. D1: resuspender la célula B de memoria purificada en 1,5E5/ml de medio n.º 1, suplementado con una combinación de citocinas, incubar durante 3 días.
- 45 2. D4: recoger las células y lavarlas con medio base, centrifugar a 300 g durante 8 minutos y resuspender las células en medio n.º 2, suplementado con una combinación de citocinas.
3. D6: recoger las células y contarlas, resuspender las células a 1,5E6/ml en medio n.º 2, añadir 10 ul de sulfato de protamina (100x) + 100 ul de GFP virus concentrado (~MDI 50) e incubar durante la noche.
- 50 4. D7: recoger las células y lavarlas con medio base, centrifugar a 300 g durante 8 minutos y resuspender en medio n.º 3, suplementado con una combinación de citocinas, incubar durante 3 días.
5. D10: recoger las células mediante centrifugación a 300 g durante 8 minutos y fijar las células en tampón de fijación durante 15 minutos a 4 ° C. Lavar las células dos veces y mantenerlas en tampón de flujo. Están listas para el análisis de flujo para determinar la eficacia de transducción.

55 Las células después de la segunda etapa son principalmente CD20-, CD38+, CD138- y, después de la tercera etapa, CD20-, CD38+, CD138+.

#### Medio: Medio Base

Medio IMDM	405 ml
FBS al 10 %	45 ml
P/S al 1 %	4,5 ml
50 ug/ml de transferrina humana (1000x)	450 ul
5 ug/ml de insulina humana (1000x)	450 ul

60

<b>Medio n.º 1 para D1-:</b>	<b>Solución de Trabajo Para 15 ml</b>	
CD40L con etiqueta His a 50 ng/ml	50 ug/ml (1000x)	15 ul
MAb anti-poli-his a 5 ug/ml	500 ug/ml (100x)	150 ul
20 U/ml de IL-2	5,7E5 u/ml (2850x)	5,25 ul
IL-10 a 50 ng/ml	100 ug/ml (2000x)	7,5 ul
IL-15 a 10 ng/ml	10 ug/ml (1000x)	15 ul
p-ODN a 10 ug/ml	10 mg/ml (1000x)	15 ul

<b>Medio n.º 2 para D4-:</b>	<b>Para 15 ml</b>	
20 U/ml de IL-2	5,7E5 u/ml (2850x)	5,25 ul
IL-10 a 50 ng/ml	100 ug/ml (2000x)	7,5 ul
IL-6 a 50 ng/ml	50 ug/ml (1000x)	15 ul
IL-15 a 10 ng/ml	10 ug/ml (1000x)	15 ul

<b>Medio n.º 3 para D7-:</b>	<b>Para 15 ml</b>	
IFN-A/D a 500 U/ml	1 E6 u/ml (2000x)	7,5 ul
IL-6 a 50 ng/ml	50 ug/ml (1000x)	15 ul
IL-15 a 10 ng/ml	10 ug/ml (1000x)	15 ul

Preparación de reactivos de solución de trabajo:

1. Se disolvieron 50 mg de insulina (Sigma) en HCl 0,005 N, la disolución se filtró (0,22 um) y se dividió en alícuotas a 1 ml/tubo y se almacenó a -20 ° C. La concentración de la solución de trabajo es de 5 mg/ml (1000x)
2. Se disolvieron 100 mg de transferrina (Sigma) en 2 ml de PBS, la disolución se filtró (0,22 um) y se dividió en alícuotas a 0,5 ml/tubo y se almacenó a -20 ° C. La concentración de la solución de trabajo es de 50 mg/ml (1000x)
3. Se disolvieron 47,95 mg de P-ODN (IDT sintetizado) en 4,795 ml de ddH2O estéril, la disolución se dividió en alícuotas a 1 ml/tubo y se almacenó a -20 ° C. La concentración de la solución de trabajo es de 10 mg/ml (1000x)
4. Se diluyó sCD40L-his (20 ug/40 ul) (Prospec) en 0,4 ml de PBS estéril/0,5 % de BSA, y la disolución se dividió en alícuotas a 130 ul/tubo y se almacenó a -20 ° C. La concentración de la solución de trabajo es de 50 ug/ml (1000x)
5. Se disolvieron 5 ug de IL15 (R&D) en 0,5 ml de PBS estéril/0,5 % de BSA, la disolución se dividió en alícuotas a 100 ul/tubo y se almacenó a -20 ° C. La concentración de la solución de trabajo es de 10 ug/ml (1000x)
6. Se disolvieron 10 ug de IL6 (R&D) en 0,2 ml de PBS estéril/0,5 % de BSA, la disolución se dividió en alícuotas a 50 ul/tubo y se almacenó a -20 ° C. La concentración de la solución de trabajo es de 50 ug/ml (1000x)
7. La IL2 (eBioscience) fue de 100 ug/ml, 5,6E6 u/mg. De modo que es 5,7E5 u/ml (2850x)
8. La IL10 (eBioscience) fue de 100 ug/ml (2000x)
9. 0,1 ml de IFN en total para 100000 U. La concentración de la solución de trabajo es 1E6 u/ml (2000x)
10. Anticuerpo anti-poli His.

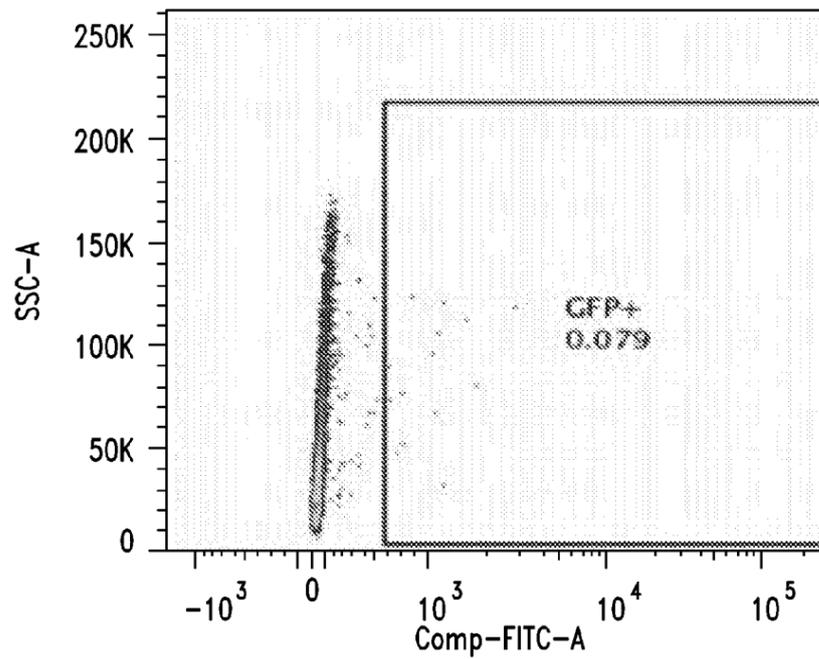
La mayor parte de la población de partida en el método anterior es CD20+, CD38-, CD138- y se transducen mal. Las células después de la segunda etapa son principalmente CD20-, CD38+, CD138- y, después de la tercera etapa, CD20-, CD38+, CD138+. Ningún método descrito en la técnica ha utilizado la diferenciación de plasmablastos y células plasmáticas *in vitro* y la ha combinado con la transducción con VSV-G. Usando este método *in vitro*, la eficacia de la transducción aumentó considerablemente, a aproximadamente el 20 %.

En particular, las condiciones de cultivo demostradas en el presente documento por primera vez generaron un periodo de tiempo durante el cual las células B eran susceptibles de transducción (Figura 1). La transducción eficaz de células B con el virus pseudotipado VSV-G requería condiciones que estimularan la proliferación de células B y dieran como resultado un fenotipo específico de células B. En la Figura 2 se muestran las variaciones en los fenotipos CD20+; CD38-, CD20-; CD38-, CD20-; y CD38+ en el transcurso de 9 días en cultivo.

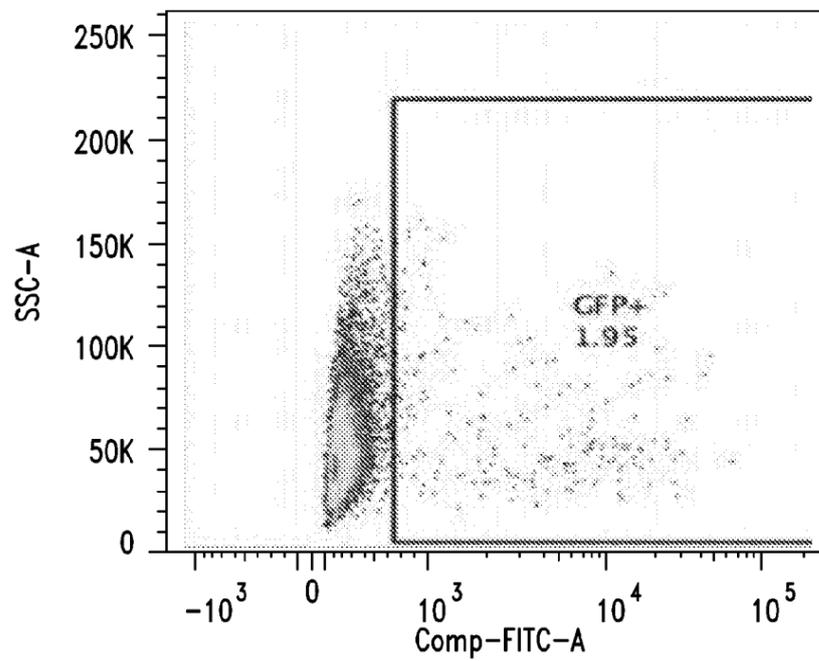
Como se muestra en la Figura 1, después de 5 días en un cultivo diseñado para promover la diferenciación de células B, las células se volvieron máximamente susceptibles a la transducción. La sincronización de las células B en transición fenotípicamente también se correlacionó con las células en un estado de máxima proliferación (Figura 3). Las condiciones de cultivo indujeron la proliferación celular y la transición fenotípica que tuvieron como resultado una eficacia de transducción significativamente mayor que la observada utilizando otros métodos. Por consiguiente, los métodos de la presente invención pueden usarse para transducir eficazmente células B para que expresen una proteína de interés, tal como un anticuerpo específico u otra proteína terapéutica.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método *in vitro* para expresar un ácido nucleico de interés en una célula B, que comprende
- 5 (a) poner en contacto células B de memoria con una composición que comprende CD40L en combinación con un factor de activación de células B que comprende uno o más de los factores seleccionados del grupo que consiste en IL-2, IL-10, IL-15 y p-ODN;
- (b) poner en contacto las células B de (a) con un factor de activación de células B que comprende uno o más de los factores seleccionados del grupo que consiste en IL-2, IL-10, IL-6 e IL-15; en condiciones tales que las células B de (b) expresen CD38;
- 10 (c) transducir las células B de (b) con un vector retroviral pseudotipado con VSV-G, en donde dicho vector retroviral comprende el ácido nucleico de interés unido operativamente a un promotor; y
- (d) poner en contacto las células B transducidas de (c) con un factor de activación de células B que comprende uno o más de los factores seleccionados del grupo que consiste en IFN- $\alpha$ ; IFN- $\delta$ , IL-6 e IL-15; expresándose así el ácido nucleico de interés en la célula B.
- 15
2. El método de la reivindicación 1, en donde el CD40L es sCD40L-his.
3. El método de la reivindicación 1, en donde la eficacia de transducción es de aproximadamente un 20 %.
- 20 4. El método de la reivindicación 1, en donde la eficiencia de transducción es superior al 20 %.
5. El método de la reivindicación 1, en donde el vector retroviral es un vector lentiviral.
6. El método de la reivindicación 1, en donde el ácido nucleico de interés comprende un ácido nucleico que codifica al menos una región VL y VH de inmunoglobulina.
- 25
7. El método de la reivindicación 1, en donde el ácido nucleico de interés codifica una proteína de anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno de la misma, una proteína de fusión o una molécula pequeña codificada por ADN.
- 30 8. El método de la reivindicación 7, en donde el anticuerpo es un anticuerpo anti-VIH, un anticuerpo anti-ARN o un anticuerpo que se une a una proteína involucrada en la regulación inmunológica.
9. El método de la reivindicación 1, en donde las células B de memoria se aíslan a partir de sangre periférica.
- 35 10. El método de la reivindicación 1, en donde las células B de (b) son CD20-, CD38+ y CD138-.
11. El método de la reivindicación 1, en donde las células B de (c) son CD20-, CD38+ y CD138+.
- 40 12. El método de la reivindicación 1, en donde el ácido nucleico de interés codifica un receptor de la superficie celular, una proteína secretada o una molécula de adhesión, opcionalmente, en donde la proteína secretada es una citocina o quimiocina.
13. El método de la reivindicación 1, en donde las células se cultivan durante 1-7 días.
- 45 14. El método de la reivindicación 1, en donde la célula B es una célula B humana.
15. El método de la reivindicación 1, en donde el método se lleva a cabo en ausencia de células alimentadoras.

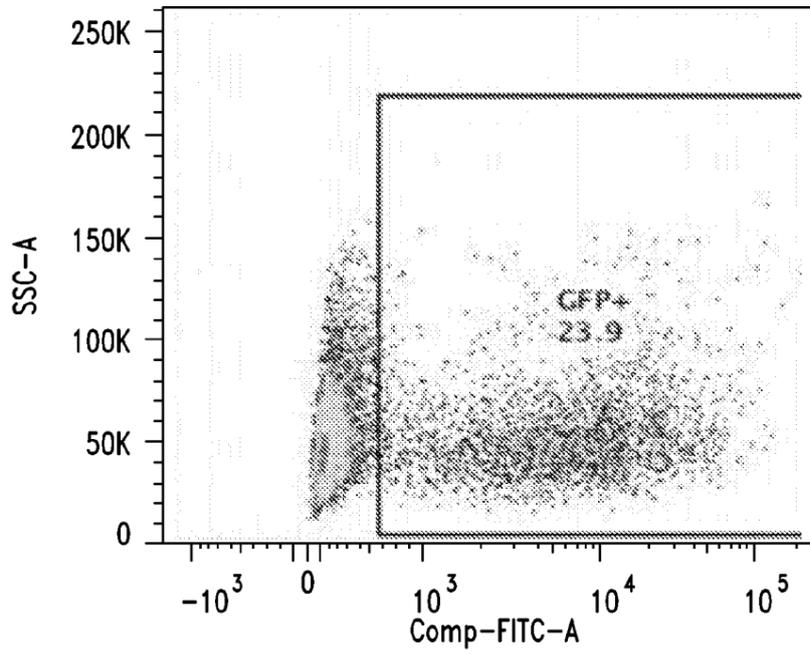


Transducidas el D0

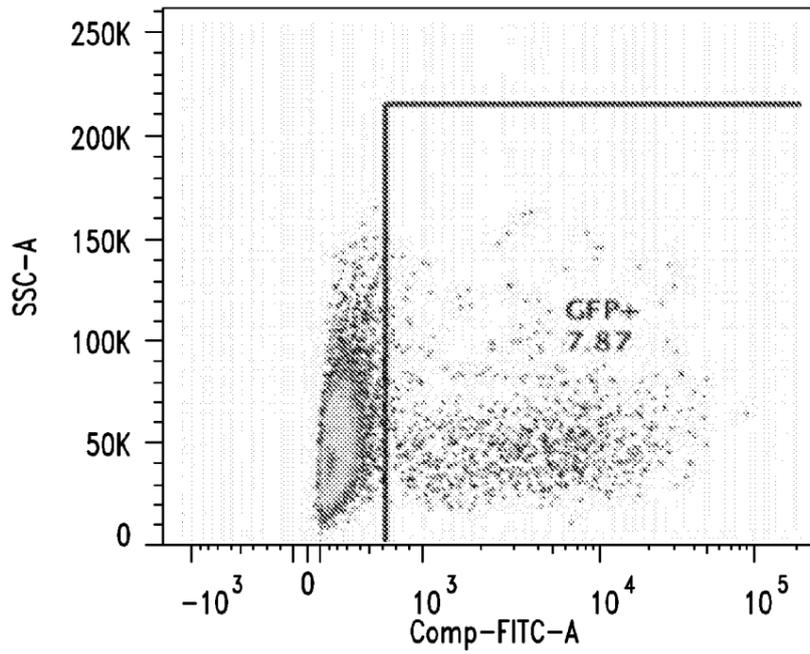


Transducidas el D4

*FIG. 1*

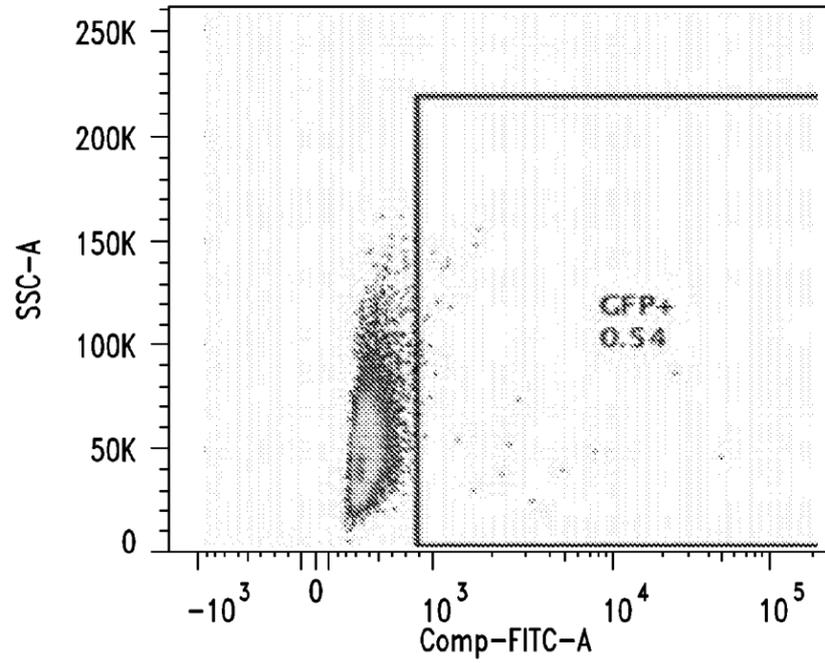


Transducidas el D5



Transducidas el D6

**FIG. 1 (Continuación)**



Transducidas el D7

***FIG. 1 (Continuación)***

Diferenciación de Células B de Memoria

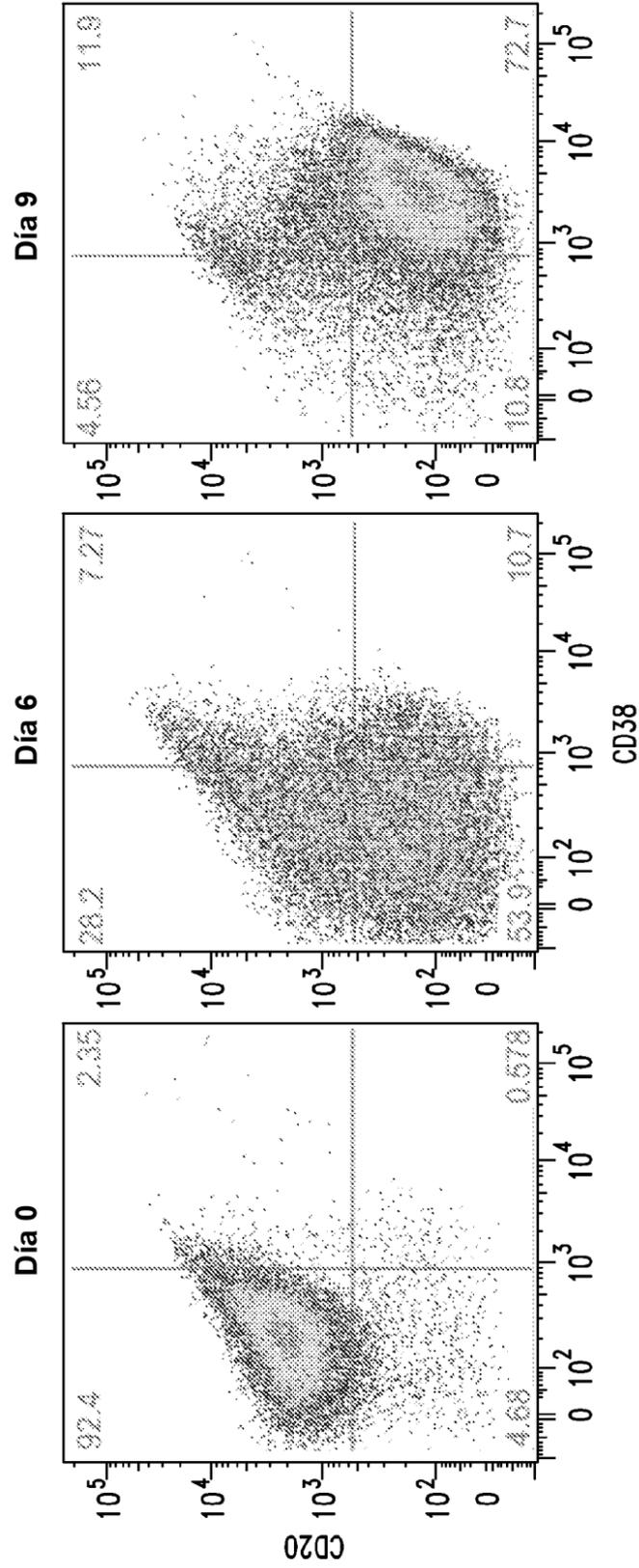
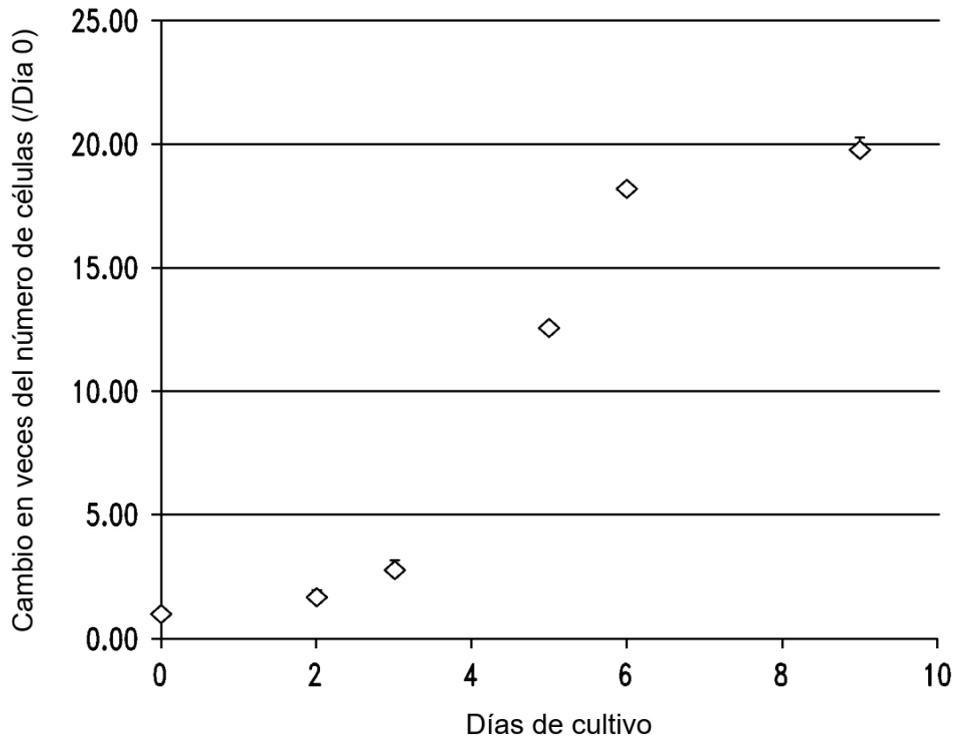


FIG. 2

### Crecimiento celular durante 9 días de cultivo



*FIG. 3*