

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 384 975**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/861** (2006.01)  
**A61K 48/00** (2006.01)  
**A61P 19/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04774913 .0**  
96 Fecha de presentación: **01.09.2004**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1664315**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.06.2006**

54 Título: **Vectores AAV para terapia genética in vivo de artritis reumatoide**

30 Prioridad:  
**01.09.2003 WO PCT/NL03/00611**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.07.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.07.2012**

73 Titular/es:  
**Academisch Medisch Centrum  
Meibergdreef 9  
1105 AZ Amsterdam, NL y  
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA  
RECHERCHE MEDICALE (INSERM)**

72 Inventor/es:  
**TAK, Paul Peter y  
JORGENSEN, Christian**

74 Agente/Representante:  
**Tomas Gil, Tesifonte Enrique**

**ES 2 384 975 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Vectores AAV para terapia genética *in vivo* de artritis reumatoide

5 Campo de la invención

[0001] La presente divulgación se refiere al campo de terapia genética basada en virus adeno-asociados (AAV), en particular, terapia genética *in vivo* de artritis reumatoide (AR). La descripción proporciona viriones recombinantes AAV que son altamente eficaces en la entrega de genes que codifican proteínas terapéuticas, tales como proteínas anti-inflamatorias o proteínas que inhiben actividad NF-κB, en las articulaciones, y métodos para uso de tales viriones en terapia genética *in vivo* y *ex vivo*.  
10

Antecedentes de la invención

[0002] La artritis reumatoide (AR) es un trastorno destructivo progresivo que se dirige principalmente a las articulaciones y se caracteriza por la hiperproliferación de tejido sinovial y la infiltración de células derivadas de sangre dando como resultado la erosión progresiva del cartílago y del hueso. La incidencia de AR ha sido proporcionada para ser alrededor de 30 por 100.000 población, y esta puede afectar a cualquier grupo de edad desde niños a ancianos. La prevalencia de la enfermedad es aproximadamente 1 por ciento a nivel mundial. Así, hay aproximadamente 150.000 pacientes de AR solo en los Países Bajos. El pico de aparición está entre las edades de 30 y 55 y, debido a los índices consistentemente más altos en mujeres, la prevalencia de AR en mujeres sobre 65 años es hasta 5 por ciento.  
15  
20

[0003] AR se asocia con un alto grado de pérdida económica, morbilidad y mortalidad temprana. Como ejemplo, casi un 80 por ciento de pacientes en un centro fueron seriamente discapacitados después de 2 años de seguimiento; un tercero adicional murió. Pacientes con AR que requieren cuidado hospitalario han aumentado al menos dos veces la mortalidad cuando se compara con normales, y AR más severa se une con índices de mortalidad más altos. El exceso de mortalidad en la AR severa se ha comparado con arteriopatía coronaria de tres vasos o fase IV de enfermedad de Hodgkin.  
25

[0004] Una apreciación de los mecanismos patógenos de AR y los malos resultados con terapia convencional ha llevado al concepto reciente de tratamiento agresivo de enfermedad temprana o recién diagnosticada para suprimir inflamación en curso y prevenir herida en la articulación. Terapia con fármacos es el soporte principal de tratamiento para todos los pacientes salvo aquellos en remisión clínica. Tal terapia debería ser instituida con los objetivos de tratar a cada paciente suficientemente para inducir una remisión y prevención de otras pérdidas de tejidos de articulaciones o función en actividades diarias. Además de terapia convencional con fármacos antirreumáticos que modifican la enfermedad, métodos nuevos dirigidos a bloqueo de TNF-α se han introducido exitosamente en clínica. Es ahora posible alcanzar 20% de mejora en aproximadamente 70% de pacientes de AR usando este método. La mayoría de este 20 % de respondedores de la American College of Rheumatology (ACR), no obstante, todavía tendrán algunas articulaciones inflamadas activamente. Aproximadamente, 30% de los pacientes no responderá a bloqueo de TNF-α con respecto a actividad de artritis.  
30  
35  
40

[0005] Corticosteroides intra-articulares son un soporte principal importante del tratamiento de sinovitis sintomática en pacientes con AR. Especialmente cuando hay actividad de artritis aislada bajo terapia sistémica antirreumática, como puede ocurrir en más pacientes, hay una indicación para tratamiento local. No obstante, no todos los pacientes responden al uso de corticosteroides y su uso se limita por efectos secundarios.  
45

[0006] La patología de AR se extiende en toda la conexión sinovial. A diferencia de la naturaleza acelular de líquido sinovial normal, líquido sinovial de AR se enriquece predominantemente con neutrófilos, pero macrófagos, linfocitos T y células dendríticas están también presentes (*Tak, P.P. Examination of the synovium and synovial fluid. En: Firestein GS, Panayi GS, Wollheim FA, editors. Rheumatoid arthritis. Frontiers in pathogenesis and treatment. New York: Oxford University Press, Inc., 2000: 55- 68*). El aumento en la celularidad es más obvio en la membrana sinovial, que se vuelve infiltrada por células reclutadas de la sangre. El estrato de revestimiento de la articulación aumenta de 1-2 células a 6-8 células de grueso y consiste principalmente en macrófagos íntimos activados y sinoviocitos tipo fibroblasto. Alteraciones en la biología normal de sinoviocitos son importantes en el desarrollo y mantenimiento del proceso de patológico asociado a AR, incluyendo invasión y destrucción de cartílago articular y del hueso. Además de la producción de mediadores solubles tales como elastasa y colagenasa, sinoviocitos median este proceso patofisiológico por la expresión de proteínas de superficie celular, que se implica en el reclutamiento y activación de linfocitos y macrófagos dentro de sinovial reumatoide. Sinoviocitos se pueden alcanzar fácilmente vía el espacio intra-articular, son relativamente longevos, y así representan un objetivo ideal para estrategias de terapia de gen (*Chernajovsky, Y. et al., 1998, Drug Aging 12:29-41; Robbins, P. D. et al., 1998, Springer Semin. Immunopathol. 20:197-209*).  
50  
55  
60

[0007] Además, la naturaleza localizada de la conexión hace la terapia genética *in vivo* muy atractiva. Muchas interacciones moleculares y celulares en la sinovial reumatoide se mantienen y se modulan por citocina. Un hallazgo consistente en la AR ha sido la abundancia de citocinas derivadas de macrófago y de fibroblasto proinflamatorias tales como IL-1, TNF-α, y IL-18 en la sinovial reumatoide. Los inhibidores de origen natural IL-1 y TNF-α, antagonista receptor de IL-1 (IL-1RA) y los receptores solubles TNF-α p55 y p75 se producen en paralelo con sus duplicados. Para IL-18 un  
65

proteína de enlace IL-18 se purifica. Terapias que proveen exceso de inhibidores de citocina recombinantes pueden desviar el equilibrio en la AR hacia un estado anti-inflamatorio. Eficacia clínica de métodos dirigidos de anti-TNF- $\alpha$  y anti-IL-1 destacan que citocinas determinadas son objetivos apropiados para terapia genética. Otro método podría ser la sobreexpresión dirigida de proteínas anti-inflamatorias biológicamente activas (p. ej. IL-4; IL-10; IL-13, y IFN- $\alpha$ ) por sinoviocitos para inhibir la cascada inflamatoria (Boyle, D. L. *et al.*, 1999, *Gene Ther.* 6:1911-1918).

[0008] NF- $\kappa$ B es claramente uno de los reguladores de expresión de gen proinflamatorio más importante (Tak, P. P. and Firestein, G. S., 2001, *J. Clin. Invest.* 107(1): 7-11). Síntesis de citocinas, tal como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, y IL-8 se media por NF- $\kappa$ B, como es la expresión de Cox-2. Aupperle *et al.* (1999, *J. Immunol.* 163: 427-433) estudió recientemente la función de IKK en sinoviocitos primarios aislados tipo fibroblasto de sinovial de pacientes con AR y osteoartritis. En ambos grupos, proteína inmunoreactiva IKK es abundante en estas células, y IKK- $\alpha$  y IKK- $\beta$  son constitutivamente expresadas en el nivel AR. La función IKK en estas células puede ser mucho mayor por de TNF- $\alpha$  y IL-1, conduciendo a degradación de endógeno I $\kappa$ B- $\alpha$  y translocación nuclear de NF- $\kappa$ B. Activación de esta vía y la inducción consecuente de IL-6, IL-8, ICAM-1, y expresión de colagenasa-1, dependen específicamente de IKK- $\beta$  (Aupperle, K. R. *et al.*, 1999, *J. Immunol.* 163: 427-433). Así, transfección con construcciones adenovirales que codifican un IKK- $\beta$  dominante negativo mutante impide translocación TNF- $\alpha$  mediada NF- $\kappa$ B nuclear y expresión genética proinflamatoria en sinoviocitos, mientras que IKK- $\alpha$  dominante negativo mutante no tiene ningún efecto (Aupperle, K. R. *et al.*, 1999, *J. Immunol.* 163: 427-433).

[0009] Modelos animales de artritis inflamatoria sostienen la noción de que la activación de NF- $\kappa$ B juega un papel patógeno *in vivo*. Por ejemplo, unión sinovial aumentada de NF- $\kappa$ B precede al desarrollo de implicación clínica de articulación en la artritis inducida por colágeno murina y gradualmente aumenta durante la evolución de enfermedad (Han, Z. N., *et al.* 1998, *Autoimmunity* 28: 197-208). Mucha de esta actividad de unión parece ser debida a p50, que ha sido implicado en transcripción de colagenasa-3 y podría contribuir, con AP-1 localmente activado, para resorción de matriz extracelular. Activación sinovial NF- $\kappa$ B también ocurre dentro de unos días después de inmunización en la artritis adyuvante de rata (Tsao, P. W. *et al.* 1997, *Clin. Immunol. Immunopathol.* 83: 173-178). Activación selectiva de NF- $\kappa$ B en ratas normales por transferencia intra-articular de un gen IKK- $\beta$  funcional, conduce a inflamación sinovial y señales clínicas de artritis (Tak, P. P. *et al.*, 2001, *Arthritis Rheum.* 44(8): 1897-907). Recíprocamente, reducción de translocación nuclear y sinovitis clínica de NF- $\kappa$ B fue observada en la artritis adyuvante en ratas después una inyección intra-articular con una construcción de IKK- $\beta$  dominante negativa adenoviral (Tak, P. P. *et al.*, 2001, *Arthritis Rheum.* 44(8): 1897-907). El papel central de NF- $\kappa$ B en la inflamación también se ha mostrado en ratas con artritis inducida por la pared de célula estreptococal (Miagkov, A. V. *et al.*, 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 13859-13864) y en ratones con artritis inducida por colágeno (CIA) (Gerlag, D. M. *et al.*, 2000, *J. Immunol.* 165: 1652-1658; Han, Z. N. *et al.* 1998, *Autoimmunity* 28:197-208).

[0010] Por lo tanto, varias estrategias dirigidas a producción local en aumento de proteínas anti-inflamatorias o dirigidas a inhibición de actividad NF- $\kappa$ B en el compartimiento sinovial por terapia genética *in vivo* es una gran promesa para el tratamiento de AR.

[0011] Para permitir producción local sostenida de dosis eficaces de proteínas terapéuticas en la articulación, en particular en la sinovial reumatoide, un sistema de entrega de gen eficaz necesita ser desarrollado. Un intervalo de diferentes vectores no víricos y víricos existe, tal como vectores adenovirales, vectores de virus adeno-asociados, vectores retrovíricos, vectores de virus de herpes, liposomas, vacunación de ADN y similares (ver Vervoordeldonk M.J.B.M y Tak P.P. 2001, *Best Practice & Research Clinical Rheumatology Vol.15 (5): 771-788*). Hasta la fecha, vectores principalmente adenovirales han sido evaluados como vectores para entrega de gen. No obstante, sus naturaleza episómica limita la duración de la expresión genética, haciéndolos así no muy adecuados para el tratamiento de artritis, donde expresión genética a largo plazo es requerida. Otra desventaja de vectores adenovirales es la presencia de proteínas virales, que pueden suscitar una respuesta inmunitaria en el huésped.

[0012] Vectores víricos adeno-asociados (AAV), por otro lado, han demostrado (en algunos tejidos) integrarse en el genoma de la célula objetivo (Hirata *et al.* 2000, *J. of Virology* 74:4612-4620), permitiendo expresión de transgen a largo plazo en células transducidas. Adenovirus asociado es un parvovirus ADN colaborador-dependiente, que no está asociado con enfermedad en seres humanos o mamíferos (para revisión ver Berns and Bohensky, 1987, *Advances in Virus Research, Academic Press Inc, 32: 243-307*). Vectores recombinantes AAV han sido demostrado ser capaces de transfectar un rango de diferentes tipos celulares, tal como células hematopoyéticas, células respiratorias epiteliales y neuronas. No obstante, para muchos tipos celulares (tal como, por ejemplo, células sinoviales, pero también muchos otros) no está claro si o se pueden o no modificar en absoluto o eficazmente por vectores AAV. Pan *et al.* (*J. of Virology* 1999, *Vol 73, 4: 3410-3417*) ha sido capaz de transfectar sinoviocitos de rata que muestran síntomas de artritis inducida de lipopolisacárido usando vectores rAAVde, pero se encontró que expresión de transgen disminuye cuando la inflamación cedió. Por otra parte, la literatura informa de muchos resultados divergentes de experimentos que tratan la entrega de gen *in vivo* para articulaciones con vectores AAV basados (Ghivizanni *et al.* 2000, *Drug Discov. Today* 6:259-267).

[0013] Un factor de complicación es que serotipos AAV difieren en el tropismo celular. La WO99/61601, por ejemplo, muestra que vectores AAV5 basados transducen ciertos tipos de células (células epiteliales de las vías respiratorias cultivadas, células de músculo estriado cultivadas y células endoteliales de vena umbilical humanas cultivadas) en una

eficiencia más alta que AAV2. Por otro lado, AAV5 fue mucho más ineficiente en transducir células COS cultivadas, 293, HeLa, células IB3 y líneas celulares MCF7, mientras ambos AAV2 y AAV5 mostraron rendimientos de transducción pobres para NIH 3T3, skbr3 y líneas celulares t-47D.

5 [0014] La WO00/73481 divulga un vector derivado de rAAV2 que codifica un polipéptido de fusión comprendiendo un dominio extracelular de un receptor TNF $\alpha$  y el dominio (Fc) constante de una molécula IgG1 y, opcionalmente, un antagonista de IL-1. Los vectores se envasan en una partícula de virus con proteínas cápsidas de AAV2 y se inyectan en articulaciones en un modelo de rata de artritis, conduciendo a una reducción en la inflamación de la articulación.

10 [0015] A pesar de la disponibilidad de los sistemas de entrega de gen no vírico y vírico anteriores, hasta la fecha ningún sistema de vector adecuado existe para entrega eficaz de genes (que codifican proteínas terapéuticas) a la sinovial reumatoide de sujetos que padecen artritis reumatoide. Permanece, por lo tanto, una necesidad de generar un sistema de entrega de gen *in vivo* y *ex vivo* adecuado a la sinovial para permitir tratamiento eficaz. La presente invención proporciona tal sistema de entrega de gen.

15 Resumen de la invención

[0016] La invención proporciona un virión rAAV comprendiendo proteínas cápsidas de AAV serotipo 5, por el cual el virión rAAV comprende un vector rAAV2 comprendiendo un elemento de expresión operativamente unido a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína terapéutica eficaz contra la artritis reumatoide.

[0017] Estos viriones rAAV, una célula sinovial transducida con estos y/o composiciones farmacéuticas comprendiendo bien dichos viriones o dichas células son para uso en el tratamiento de artritis reumatoide, como se describe en las reivindicaciones anexas.

25 [0018] En una forma de realización alternativa, la invención proporciona unos métodos para transducir células reumatoideas sinoviales *ex vivo* usando un virión rAAV como se ha descrito anteriormente, opcionalmente seleccionar las células transducidas.

30 [0019] En otra forma de realización, esta descripción se refiere a un virión recombinante AAV comprendiendo proteínas cápsidas de AAV serotipo 5 o AAV serotipo 2, por las cuales el virión rAAV comprende un vector rAAVX, donde el vector rAAVX comprende un elemento de expresión operativamente unido a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína terapéutica eficaz contra la artritis reumatoide.

35 Descripción de las figuras

Figura 1

40 [0020] Coloración X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosidasa) (resultados de análisis de imagen cuantificado digital) de coloración directa *in situ* de secciones congeladas de articulaciones de rata tratadas transducidas con rAAV1, rAAV2, rAAV3, rAAV4, rAAV5, un vector de control y adenovirus expresando el gen para LacZ.

Figura 2

45 [0021] Coloración directa *in situ* de X-gal (azul) de secciones congeladas de articulaciones de rata inyectadas con rAAV1 a rAAV2.

Figura 3

50 [0022] Mapa físico de plásmido pVD11 con un vector rAAV2 en el que un casete de expresión que contiene el lacZ de *E. coli* que codifica secuencias conducido por el promotor CMV se flanquean por secuencias AAV2 ITR.

Figura 4

55 [0023] Expresión beta-gal en el tejido sinovial de rata 1, 2, 3 y 4 semanas después de inyección i.a de rAAV 2 y 5, cuantificado por análisis de imagen digital.

Figura 5

60 [0024] Desarrollo de neutralización de anticuerpos en el suero después de inyección intraarticular de rAAV2 o rAAV5.

Figura 6

65 [0025] rAAV 5 media transferencia de gen para sinoviocitos humanos tipo fibroblasto (FLS) *in vitro*. FLS humano aislado de biopsias sinoviales de pacientes de AR fueron transducidos con AAV5.GFP. Cuarenta y ocho horas después de la

transfección las células fueron fijadas microscopía fluorescente. A: células fluorescentes, B: fotografía de contraste de fase.

#### Descripción detallada de la invención

##### A. Definiciones generales

[0026] "Gen" o "secuencia codificadora" se refiere a una región ADN o ARN (la región transcrita) que "codifica" una proteína particular. Una secuencia codificante es transcrita (DNA) y traducida (RNA) en un polipéptido cuando se coloca bajo el control de una región reguladora apropiada, tal como un promotor. Un gen puede comprender diferentes fragmentos operativamente unidos, tal como un promotor, una secuencia líder '5, una secuencia codificante y una secuencia no traducida '3, comprendiendo un sitio de poliadenilación. Un gen recombinante o quimérico es un gen normalmente no encontrado en la naturaleza, tal como un gen en el que, por ejemplo, el promotor no está asociado en la naturaleza con parte o toda la región de ADN transcrita. "Expresión de un gen" se refiere al proceso donde un gen es transcrito en un ARN y/o traducido en una proteína activa.

[0027] Como se utiliza en este caso, el término "promotor" se refiere a un fragmento de ácido nucleico que funciona para controlar la transcripción de uno o más genes, localizado arriba con respecto a la dirección de transcripción del sitio de iniciación de transcripción del gen, y es estructuralmente identificado por la presencia de un sitio de unión para RNA-polimerasa dirigida por DNA dependiente de ADN, sitios de iniciación de transcripción y cualquier otra secuencia de ADN, incluyendo, pero no limitado a, sitios de unión de factores de transcripción, represor y sitios de unión a proteínas activadoras, y cualquier otra secuencia de nucleótidos conocida por uno de habilidad en la técnica para actuar directa o indirectamente para regular la cantidad de transcripción del promotor. Un promotor "constitutivo" es un promotor que es activo en la mayoría de tejidos con muchas condiciones desarrollables y fisiológicas. Un promotor "inducible" es un promotor que es fisiológicamente o desarrollablemente regulado. Un promotor "específico de tejido" solo es activo en tipos específicos de tejidos o células.

[0028] Como se utiliza en este caso, el término "operativamente unido" se refiere a dos o más ácidos nucleicos o elementos de secuencia de aminoácidos que son físicamente unidos de manera que están en una relación funcional entre sí. Por ejemplo, un promotor es operativamente unido a una secuencia codificante si el promotor es capaz de iniciar o de otra manera controlar/regular la transcripción y/o expresión de una secuencia codificante, en cuyo caso la secuencia codificante debería ser entendida como que está "bajo el control" del promotor. Generalmente, cuando dos secuencias de ácidos nucleicos son operativamente unidas, estas estarán en la misma orientación y normalmente también en el mismo marco de lectura. Normalmente también están esencialmente contiguos, aunque esto puede no ser requerido.

[0029] Los términos, "secuencia de señal" "péptido señal" y "guía secretora" se usan de forma intercambiable y se refieren a una extensión corta continua (normalmente aproximadamente 15-60 aminoácidos) de aminoácidos normalmente presentes en el amino-terminal de polipéptidos unidos de membrana y segregados y que dirige su entrega a varios lugares exteriores al citosol. Así, selección específica o señales objetivas, que incluyen secuencias de señal, pueden dirigir la entrega de polipéptidos en el núcleo, RE, mitocondria, peroxisomas, etc. Secuencias de señal normalmente contienen un núcleo hidrofóbico de aproximadamente 4-15 aminoácidos, que es frecuentemente precedido inmediatamente por un aminoácido básico. En el extremo carboxi-terminal del péptido señal hay un par de, aminoácidos pequeños sin carga separados por un único aminoácido de intervención que define el sitio de escisión de péptido señal. von Heijne, G. (1990) *J. Membrane Biol.* 115: 195-201. A pesar de sus similitudes funcionales y totales estructurales, péptidos señal nativos no tienen una secuencia de consenso.

[0030] "Entrega de gen" o "trasferencia de gen" se refieren a métodos para introducción fiable de ADN extranjero o recombinante en células huésped. El ADN transferido puede quedar no integrado o integrado preferiblemente en el genoma de la célula huésped. Entrega de gen puede tener lugar, por ejemplo, por transducción, usando vectores víricos, o por transformación de células, usando métodos conocidos, tales como electroporación, bombardeo celular y similares.

[0031] "Vector" se refiere generalmente a construcciones de ácidos nucleicos adecuadas para clonación y expresión de secuencias de nucleótidos. El término vector puede también a veces referirse a transportar vehículos comprendiendo el vector, tal como virus o viriones, que son capaces de transferir el vector en y entre células huésped.

[0032] "Vector rAAV", como se utiliza en este caso, se refiere a un vector recombinante derivado de un serotipo de virus adeno-asociado, tal como AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5 y otros. Vectores rAAV tienen uno o preferiblemente todos los genes AAV de tipo salvaje eliminados, pero todavía comprenden secuencias de ácidos nucleicos funcionales ITR. Secuencias funcionales ITR son necesarias para la replicación, rescate y empaquetamiento de viriones AAV. Las secuencias ITR pueden ser secuencias de tipo salvaje o secuencias sustancialmente idénticas (como se define más adelante) o se pueden alterar por, por ejemplo, en inserción, mutación, delección o sustitución de nucleótidos, mientras estos permanecen funcionales.

[0033] "Vector rAAV", como se utiliza en este caso, se refiere a un vector recombinante AAV comprendiendo las secuencias de ácidos nucleicos ITR de cualquiera de los serotipos AAV, o secuencias de ácidos nucleicos que son sustancialmente idénticas a las secuencias ITR de tipo salvaje de serotipo particular AAV, mientras estos permanecen funcionales. Secuencias de nucleótidos de elección se insertan entre las secuencias ITR AAV, por ejemplo, construcciones de expresión comprendiendo un elemento regulador de expresión operativamente unido a una secuencia codificante y un secuencia de terminación '3. El término "vector rAAVX", como se utiliza en este caso, se refiere a un vector recombinante AAV comprendiendo las secuencias de ácidos nucleicos ITR del serotipo AAVX, o secuencias de ácidos nucleicos que son sustancialmente idénticas a las secuencias del serotipo AAVX ITR de tipo salvaje, mientras que permanecen funcionales. El término "vector rAAV2" o "vector AAV5" es así usado para indicar un vector rAAV2 o rAAV2 comprendiendo respectivamente las secuencias de ácidos nucleicos ITR de serotipo AAV 5 o serotipo 2, o secuencias de ácidos nucleicos sustancialmente idénticas a estos.

[0034] "Virión AAV" se refiere a una partícula de virus completa, tal como, por ejemplo, una partícula de virión AAV de tipo salvaje, que comprende ADN de genoma monocatenario empaquetado en proteínas cápsidas AAV. La molécula de ácido nucleico monocatenaria es bien hebra codificante o hebra no codificante, mientras ambas hebras son igualmente infecciosas. Un "virión rAAV" se refiere a una partícula de virus recombinante AAV, es decir, una partícula que es infecciosa pero de replicación defectuosa. Está compuesto por una cubierta de proteína AAV y comprende un vector rAAV. En el contexto de la presente invención, la cubierta de proteína puede ser de un serotipo diferente al del vector rAAV. Un virión AAV de la invención puede así ser compuesto por una cubierta de proteína, es decir, la cápsida icosaédrica, que comprende proteínas de cápsida (VP1, VP2, y/o VP3) de un serotipo AAV, por ejemplo, serotipo AAV 5, mientras que el vector rAAV contenido en ese virión AAV5 puede ser cualquiera de los vectores rAAVX anteriormente descritos, incluyendo un vector AAV5. Un "virión AAV5" comprende así proteínas cápsidas de serotipo AAV 5, mientras, por ejemplo, un virión rAAV2 comprende proteínas cápsidas de serotipo AAV 2, por lo cual bien puede comprender cualquiera de los vectores rAAVX de la invención.

[0035] "Funciones auxiliares de AAV" generalmente se refieren a las funciones AAV correspondientes requeridas para replicación de rAAV y empaquetamiento suministrado al virión rAAV o vector rAAV en *trans*. Funciones auxiliares AAV complementan las funciones AAV que faltan en el vector rAAV, pero carecen de ITR AAV (que se proporcionan por el vector rAAV). Funciones auxiliares AAV incluyen los dos ORF importantes de AAV, a saber, la región de codificación rep y la región de codificación cap o secuencias funcionales idénticas sustancialmente de estas. Regiones Rep y Cap se conocen bien en la técnica, ver, por ejemplo, Chiorini *et al.* (1999, *J. of Virology*, Vol 73(2): 1309-1319) o US 5,139,941, incorporadas aquí como referencia. Las funciones auxiliares AAV se pueden suministrar en una construcción auxiliar AAV. Introducción de la construcción auxiliar en la célula huésped puede ocurrir, por ejemplo, por transformación o transducción antes de o al mismo tiempo que la introducción del vector rAAV. Las construcciones auxiliares AAV de la invención pueden así ser elegidas de manera que estas producen la combinación deseada de serotipos para las proteínas cápsidas del virión rAAV de una parte y para la replicación del vector rAAVX y empaquetamiento por otro lado.

[0036] "Virus auxiliar de AAV" proporciona funciones adicionales requeridas para replicación de AAV y empaquetamiento. Virus auxiliares adecuados AAV incluyen adenovirus, virus herpes simple (tal como tipos HSV 1 y 2) y virus de vaccinia. Las funciones adicionales proporcionadas por el virus auxiliar pueden también ser introducidas en la célula huésped vía vectores, como se describe en la US 6,531,456, incorporada aquí como referencia.

[0037] Un "transgen" es aquí definido como un gen que ha sido introducido recientemente en una célula, es decir, un gen que normalmente no ocurre en la célula. El transgen puede comprender secuencias que son nativas a la célula, secuencias que naturalmente no ocurren en la célula y este puede comprender combinaciones de ambos. Un transgen puede contener codificación de secuencias para una o más proteínas que pueden estar operativamente unidas a secuencias reguladoras apropiadas para expresión de las secuencias de codificación en la célula. Preferiblemente, el transgen se integra en el genoma de la célula huésped.

[0038] "Transducción" se refiere a la entrega de una molécula de ADN en una célula huésped receptora por un virión AAV. Por ejemplo, transducción de una célula diana por un virión rAAV de la invención conduce a transferencia del vector rAAVX contenido en este virión en la célula transducida. "Célula huésped" o "célula diana" se refieren a la célula en la que la entrega de ADN se desarrolla, tal como los sinoviocitos de un sujeto. Viriones AAV son capaces de transducir ambas células de división y de no división.

[0039] "Sujetos" significa cualquier miembro de la clase mamíferos, incluyendo, sin limitación, seres humanos, primates no humanos, animales de granja, animales domésticos y animales de laboratorio.

[0040] El término "intra-articular" se refiere al interior de una articulación, p.j., rodilla, codo, hombro, tobillo, muñeca, etc. Así, una inyección intra-articular es una inyección en el espacio entre los huesos de una articulación. En la rodilla, "intra-articular" se refiere al espacio entre el fémur y la tibia, detrás y circundante a la rótula.

[0041] El término "sustancialmente idéntico" significa que dos péptidos o dos secuencias de nucleótidos, cuando están alineados óptimamente, tal como por el programa GAP o BESTFIT usando parámetros predeterminados, proporcionan al menos 80 por ciento de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 90 por ciento de identidad de secuencia, más preferiblemente al menos 95 por ciento de identidad de secuencia o más (p. ej., 99 por ciento de identidad de

secuencia). GAP usa el algoritmo de Needleman y Wunsch de alineación global para alinear dos secuencias sobre su longitud entera, maximizando el número de coincidencias y minimizando el número de espacios. Generalmente, los parámetros GAP predeterminados son usados, con una penalización de creación del espacio = 50 (nucleótidos) / 8 (proteínas) y penalización de extensión del espacio = 3 (nucleótidos) / 2 (proteínas). Para los nucleótidos de la matriz de puntuación predeterminados usada es nwsgapdna y para proteínas de la matriz de puntuación predeterminadas es Blossum62 (Henikoff & Henikoff, 1992).

[0042] El término "comprendiendo" debe ser interpretado como especificando la presencia de las partes declaradas, pasos o componentes, pero no excluye la presencia de una o más partes adicionales, pasos o componentes. Una secuencia de ácidos nucleicos comprendiendo región X, puede así comprender regiones adicionales, es decir, región X se puede introducir en una región de ácido nucleico más grande.

B. Formas de realización de la invención

[0043] AAV es un virus de ADN no cubierto, que requiere un virus auxiliar para replicar. Vectores recombinantes AAV tienen varias ventajas importantes sobre otros vectores, ya que no son patógenos en seres humanos, inmunológicamente inertes y permiten expresión genética *in vivo* a largo plazo. Su capacidad para mediar expresión de genes terapéuticamente pertinentes es ahora bien establecida en diferentes modelos experimentales de artritis. Aunque un número en aumento de serotipos AAV ha sido identificado, todos los estudios hasta el momento han sido realizados con serotipo 2 (AAV2). Serotipos diferentes tienen proteínas con cubierta de viriones diferentes y, como consecuencia, varían en su tropismo.

[0044] Los presentes inventores han encontrado sorprendentemente que viriones AAV de diferentes serotipos varían considerablemente en su eficiencia de transducción cuando se usan como vectores AAV para entrega de genes *in vivo* a las articulaciones artríticas, en particular, a la sinovial. Cuando se comparan los rendimientos de transducción de viriones recombinantes comprendiendo vectores rAAV basados en cinco serotipos diferentes AAV (AAV1 a AAV) codificando la fosfatasa alcalina segregada de murina de genes indicadores (mSEAP) o beta-galactosidasa de *E. coli* (beta-Gal), en dos modelos de animal diferentes de artritis (ratón y rata), se encontró sorprendentemente que transferencia de gen *in vivo* fue mucho más eficaz con viriones AAV5 que con los viriones basados en serotipos AAV1 a AAV4. Los inventores así han sido capaces de proporcionar un sistema de entrega de gen eficaz para células sinoviales, la invención, por lo tanto, divulga métodos terapéuticos para el tratamiento de artritis reumatoide, en particular, el tratamiento de articulación reumatoide, basado en terapia genética *in vivo* de la sinovial reumatoide.

[0045] Es una forma de realización de la invención proporcionar usos en los que moléculas de ácido nucleico se entregan localmente a articulaciones artríticas, en particular, a la sinovial reumatoide. En particular, los usos proporcionados permiten la transducción eficaz de proteínas terapéuticas de codificación de moléculas de ácido nucleico en células reumatoides sinoviales y tejidos en una cantidad terapéuticamente eficaz y durante un periodo de tiempo terapéuticamente eficaz. Los usos de la invención proporcionan expresión de nivel alto mejorada sostenida (a largo plazo) de proteínas terapéuticas en células diana. Sin limitar el alcance de la descripción, es especialmente alta la eficiencia de transducción del rAAV5, y a una extensión inferior el viriones AAV2, en combinación con los vectores rAAV de la invención, que habilita entrega de gen vivo eficaz. Aunque viriones rAAV comprendiendo proteínas cápsidas de ambos serotipos AAV 5 y 2 pueden usarse ventajosamente en la presente divulgación, viriones rAAV comprendiendo proteínas cápsidas de serotipo AAV 5 (viriones rAAV5) son así usos más preferidos para uso según la invención.

[0046] Los usos aquí descritos comprenden los pasos de proporcionar un virión recombinante AAV (rAAV) comprendiendo proteínas cápsidas de serotipo AAV 5 o serotipo AAV 2, donde el virión rAAV comprende un vector rAAVX, el vector rAAVX comprendiendo un elemento de expresión operativamente unido a una secuencia de ácidos nucleicos. El virión rAAV debe ser puesto en contacto con la célula sinovial, por lo cual transducción del vector rAAVX produce expresión de la secuencia de ácidos nucleicos en las células sinoviales transducidas. Preferiblemente en los usos aquí descritos, la secuencia de ácidos nucleicos debe ser entregada a la célula sinovial *in vivo*, por administración local del virión rAAV a una conexión reumatoide de un sujeto. Preferiblemente, administración del virión rAAV es por inyección en la articulación, más preferiblemente por inyección en el compartimiento sinovial. Alternativamente, en los usos aquí descritos, el virión rAAV se pone en contacto con células sinoviales o cultivos de células comprendiendo células sinoviales *ex vivo*, y por lo cual opcionalmente las células transducidas son seleccionadas. El uso alternativo puede comprender además un paso en el que las células transducidas se deben administrar a una articulación reumatoide de un sujeto, por lo cual, preferiblemente administración de las células transducidas se realiza por inyección en la articulación, preferiblemente por inyección en el compartimiento sinovial. Preferiblemente en estos usos, la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos en la célula sinovial transducida *in vivo* o *ex vivo* produce una reducción de síntomas de artritis de la articulación.

[0047] El virión recombinante AAV, incluyendo uno de los vectores rAAVX, se produce usando métodos conocidos en la técnica, como se describe en Pan *et al.* (*J. of Virology* 1999, Vol 73(4):3410-3417) y Clark *et al.* (*Human Gene Therapy*, 1999, 10: 1031-1039), incorporados aquí como referencia. En resumen, los métodos generalmente implican (a) la introducción del vector rAAV en una célula huésped, (b) la introducción de una construcción auxiliar AAV en la célula huésped, donde la construcción auxiliar comprende las funciones víricas que faltan del vector rAAV y (c) introducción de un virus auxiliar en la célula huésped. Todas las funciones para replicación de virión rAAV y empaquetamiento necesitan

- estar presentes, para conseguir la replicación y empaquetamiento del vector rAAV en viriones rAAV. La introducción en la célula huésped puede llevarse a cabo usando técnicas virológicas estándar y puede ser de manera simultánea o consecutiva. Finalmente, las células huésped se cultivan produciendo viriones rAAV y se purifican usando las técnicas estándar tales como gradientes CsC1 (Xiao *et al.* 1996, *J. Virol.* 70: 8098-8108). Actividad de virus auxiliar residual puede ser inactivada usando métodos conocidos, tales como, por ejemplo, inactivación térmica. El virión purificado rAAV es luego preparado para uso en los métodos. Títulos altos superiores a  $10^{12}$  partículas por ml y pureza alta (libre de auxiliar detectable y virus de tipo salvaje) pueden conseguirse (Clark *et al. supra* and Flotte *et al.* 1995, *Gene Ther.* 2: 29-37).
- 5 [0048] El vector rAAVX comprende al menos las secuencias de nucleótidos de las regiones de repetición terminales invertidas (ITR) de uno de los serotipos AAV, o secuencias de nucleótidos sustancialmente idénticas a estas, y al menos una secuencia de nucleótido que codifica una proteína terapéutica (bajo control de un elemento regulador adecuado) insertado entre las dos ITR.
- 10 [0049] El genoma completo de AAV5 y otros serotipos AAV se han secuenciado (Chiorini *et al.* 1999, *J. of Virology Vol.* 73, No.2, p1309-1319) y la secuencia de nucleótidos está disponible en GenBank (N° de acceso AF085716). Las secuencias de nucleótidos ITR de AAV5 están así fácilmente disponibles para un experto en la materia. Pueden bien clonarse o hacerse por síntesis química como se conoce en la técnica, usando, por ejemplo, un sintetizador oligonucleótido como se suministra, por ejemplo, por Applied Biosystems Inc. (Fosters, CA, EEUU) o por técnicas de biología molecular estándar. Las ITR pueden ser clonadas del genoma vírico AAV o cortadas de un vector comprendiendo las ITR de AAV. Las secuencias de nucleótidos ITR puede ser bien ligadas al final de la secuencia de codificación de nucleótidos una o más proteínas terapéuticas usando técnicas de biología molecular estándar, o la secuencia AAV de tipo salvaje entre las ITR se puede sustituir con la secuencia de nucleótidos deseada.
- 15 20 [0050] Preferiblemente, el vector rAAV no comprende cualquier proteína viral de codificación de secuencias de nucleótidos, tal como genes *rep* (replicación) o *cap* (cápsida) de AAV. El vector rAAV puede comprender además una marcador o gen indicador, tal como un gen, por ejemplo, codificando un gen de resistencia antibiótica, una proteína fluorescente (p. ej. *gfp*) o un gen que codifica un producto químicamente, enzimáticamente o de otra manera detectable y/o seleccionable (p. ej. *lacZ*, *aph*, etc.) conocido en la técnica.
- 25 30 [0051] El vector rAAV comprende además una secuencia del promotor operativamente unido a la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína terapéutica. Secuencias promotoras adecuadas son promotores que confieren expresión en células de la sinovial reumatoide, tal como en macrófagos íntimos y/o en sinoviocitos tipo fibroblasto y/o otras células sinoviales tales como, pero no limitado a, células T. Promotores adecuados son, por ejemplo, los promotores de genes conocidos por ser expresados en células sinoviales, tales como el promotor CMV (citomegalovirus), el promotor del gen IL-6 o el promotor SV40, y otros, como fácilmente se determina por un experto en la materia.
- 35 40 [0052] Una secuencia 3' no traducida adecuada puede también ser operativamente unida a la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína terapéutica. Regiones 3' adecuadas no traducidas pueden ser aquellas naturalmente asociadas a la secuencia de nucleótidos o se pueden derivar de distintos genes, tal como, por ejemplo, la secuencia de región no traducida 3' de hormona de crecimiento bovina (BGH polyA).
- 45 50 [0053] El tamaño total de la molécula de ADN insertada en el vector rAAV entre las regiones ITR es generalmente más pequeño que 5 kilobases (kb) en tamaño. También se prevé que el vector rAAV comprenda secuencias de nucleótido que codifican dos proteínas terapéuticas (p. ej. proteínas terapéuticas con un efecto sinérgico). Estas pueden bien comprender un promotor adecuado y una región 3' no traducida adecuada cada una, o se pueden unir por un elemento IRES (sitios de introducción de ribosomas internos, proporcionando un transcrito bicistrónico bajo control de un único promotor). Elementos de IRES adecuados se escriben en, por ejemplo, Hsieh *et al.* (1995, *Biochemical Biophys. Res. Commun.* 214:910-917).
- 55 [0054] Opcionalmente, secuencias de nucleótidos adicionales pueden unirse operativamente a la secuencia(s) de nucleótido que codifica la proteína terapéutica, tal como secuencias de nucleótidos que codifican péptidos de señal (p. ej. para transporte objetivo del péptido al espacio extracelular), señales de localización nucleares, potenciadores de expresión, y similares.
- 60 65 [0055] Una "proteína terapéutica", como se utiliza en este caso, se refiere a una proteína, que tiene un efecto terapéutico en la artritis reumatoide cuando se administra localmente a la articulación reumatoide (en particular, a la sinovial) en una cantidad eficaz (o dosificación). Proteínas terapéuticas adecuadas son, por ejemplo, inhibidores de citocina tales como interleuquina-1 (March *et al.* 1985, *Nature* 315:641-647) o inhibidores de TNF $\alpha$ , antagonistas de receptores de citocina tales como, por ejemplo, el antagonista receptor de interleuquina-1 IL-Ra (Cominelli *et al.* 1994, *J. Biol. Chem.* 269(9): 6962-6971), proteínas de unión de citocina tales como IL-18 proteína de unión (Im *et al.* 2002, *J. Interferon Cytokine Res.* 22(3): 321-328) o receptores de citocina solubles tales como receptor de sTNF $\alpha$  p55 o p75 (Croxford *et al.*, 2000, *J. of Immunology* 164: 2776-2718) o el receptor soluble IL-1. También adecuadas son secuencias que codifican anticuerpos de TNF $\alpha$ , como se conocen en la técnica, por ejemplo, en la US 6,277,969 y secuencias que codifican secuencias antisentido o de ARN de interferencia para TNF $\alpha$ , conocidas en la técnica *per se*, por ejemplo, en



la US 6,046,319. También adecuadas son proteínas con actividad anti-inflamatoria, tal como IL-4; IL-10; IL-13, de IFN- $\beta$  o VIP (*Vasoactive intestinal peptide*; Delgado, 2003, *Trends Immunol.* 24: 221-4). Además, dn-IKK- $\beta$  (I $\kappa$ B-quinasa dominante negativa), que inhibe la activación de NF- $\kappa$ B, es una proteína adecuada para ser usada. Una lista de proteínas adecuadas se provee en *Vervoordeldonk and Tak, 2001 (supra)*:

5

Producto <sup>a</sup> genético	Comentarios
IL-IRA, IL-IsR, TNFsR	Bloquea actividad IL-I/TNF, mejora síntomas inflamatorios, impide progresión de enfermedad y destrucción de articulación
IL-4, (v)IL-10, IL-13, IFN- $\beta$	Anti-inflamatorio, opone la producción y efectos de citocinas proinflamatorias; inhibe actividad Th-I
TGF- $\beta$	Inmunosupresor
Oligonucleótidos señuelo	Impide unión de factores de transcripción a los genes objetivo
Dn-IKK- $\beta$	Inhibe activación de NF- $\kappa$ B
FasL, FADD, quinasa de timidina de herpes (seguido de ganciclovir)	Inducción de apoptosis
CTLA-4	Inhibe coestimulación de linfocitos

<sup>a</sup> IL-RA = antagonista receptor de interleucina-I; IL-IsR = soluble receptor IL-I; TNFsR = receptor factor de necrosis de tumor soluble; vIL-10 = vírico IL-10 de IFN- $\beta$  = beta de interferón; TGF- $\beta$  = factor de crecimiento de transformación; dn-IKK- $\beta$  = dominante negativo I $\kappa$ B-quinasa  $\beta$ ; NF- $\kappa$ B = factor nuclear  $\kappa$ B; FADD = proteína de dominio de muerte asociada a Fas

10

15

20

[0056] Secuencias de nucleótidos que codifican estas proteínas están fácilmente disponibles para un experto en la materia. Las secuencias (ambos nucleótido y proteína) pueden, por ejemplo, encontrarse en bases de datos, tal como GenBank, SwissProt, y otras, y clones comprendiendo las secuencias pueden principalmente ser obtenidos de depositarios tales como la American Type Culture Collection (ATCC).. En una forma de realización preferida, las secuencias de nucleótidos son de origen humano, pero estas pueden también originarse de otras especies. Estas pueden ser secuencias de ADNc o de ADN genómico. Secuencias de nucleótidos que codifican proteínas terapéuticas abarcan secuencias de origen natural o de *nov*o sintéticas, al igual que secuencias de nucleótidos que codifican fragmentos terapéuticamente activos, formas mutadas o polipéptidos modificados (referidos como "variantes"). Variantes pueden generarse fácilmente y evaluarse para la retención de funcionalidad usando métodos conocidos en la técnica, tal como, pero no limitado a, sustituciones de aminoácido o deleciones, síntesis química de péptidos de *nov*o o de mutagénesis o técnicas de *gen-shuffling*, técnicas de hibridación. Variantes de los péptidos terapéuticos incluyen péptidos con secuencias de aminoácidos con al menos 80, 90, 95 o 99% de "identidad de secuencia sustancial" a la proteína de origen natural, que retienen su eficacia terapéutica, es decir, la capacidad para reducir o suprimir los síntomas de artritis reumatoide en sujetos.

25

30

[0057] Los vectores rAAV de la presente divulgación pueden además de una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína terapéutica comprender un segunda o más secuencias de nucleótidos que codifican una proteína que proporciona para mecanismo de fallo de seguridad que permite curar a un sujeto a partir del vector rAAV o de células transducidas con lo estos, si se cree necesario. Tal secuencia de nucleótidos, frecuentemente referida como un gen suicida, codifica una proteína que es capaz de convertir un profármaco en una sustancia tóxica que es capaz de matar las células transgénicas en las que la proteína es expresada. Ejemplos adecuados de tales genes suicidas incluyen, por ejemplo, el gen de de aminasa de citosina de *E. coli* o uno de los genes de timidina quinasa de virus herpes simple, citomegalovirus y virus de varicela-Zoster, en cuyo caso ganciclovir se puede utilizar como profármaco para matar las células transgénicas IL-10 en el sujeto (ver, por ejemplo, Clair *et al.*, 1987, *Antimicrob. Agents Chemother.* 31: 844-849).

35

40

[0058] La administración ocurre preferiblemente por vectores rAAV como se describe en otra parte de este documento. Un "efecto terapéutico" en la artritis reumatoide y, en particular, en la sinovial reumatoide, se refiere a una reducción en los síntomas típicos, tal como una reducción en la inflamación del tejido sinovial y/o una reducción en el cartílago y/o destrucción de hueso de la articulación. Una reducción puede también significar una ralentización en la progresión de desarrollo de síntomas o a una desaparición completa de los síntomas. Síntomas, y así también una reducción en síntomas, pueden ser evaluados usando una variedad de métodos, en gran parte los mismos métodos como usados en diagnóstico de artritis reumatoide, incluyendo examen clínico y pruebas de laboratorio rutinarias. Tales métodos incluyen ambos métodos microscópicos y macroscópicos, al igual que métodos moleculares, rayos X, bioquímico, inmunohistoquímico y otros. Los métodos pueden implicar análisis de la articulación entera (p. ej. rayos X), o de partes de esta, tal como líquido sinovial extraído o biopsias de tejido sinovial. Líquido sinovial reumatoide, que está en contacto directo con la sinovial y el cartílago articular, tiene un alto valor de diagnóstico y es fácilmente accesible por aspiración (ver Tak P.P., *Rheumatoid Arthritis 2000:55-68, supra*).

[0059] La cantidad terapéuticamente eficaz necesitada para conseguir un efecto terapéutico puede variar, dependiendo del sujeto tratado (p. ej. mamífero no humano o humano), las proteína(s) terapéuticas codificadas (incluyendo la resistencia y especificidad del promotor, el sitio de integración, etc.) y de la fase desarrollable y gravedad de la artritis reumatoide de la articulación. Hay gran variación de inflamación sinovial entre individuos, articulaciones e incluso dentro de articulaciones (v). Asimismo, el periodo terapéuticamente eficaz de tiempo (el tiempo que tarda hasta que un efecto terapéutico se vuelve detectable) puede variar entre individuos y entre articulaciones y dependiendo del transgen. Además, el tratamiento puede tener que repetirse en etapas posteriores para eficacia. Un experto en la materia puede fácilmente determinar la cantidad terapéuticamente eficaz por tanteo de rutina y por, por ejemplo, dibujo de curvas de respuesta a la dosis. Una administración de al menos  $10^3$  a  $10^5$  viriones rAAV, preferiblemente al menos  $10^7$  o  $10^8$  viriones, más preferiblemente  $10^9$  a  $10^{11}$  viriones o más será una dosis adecuada.

[0060] Preferiblemente, el vector rAAV es estable integrado en el genoma de la célula transducida y proporciona expresión a largo plazo (al menos 4-8 semanas, preferiblemente al menos 8-12 semanas, más preferiblemente al menos 6 meses o larga duración) de la proteína terapéutica.

[0061] Administración local (por oposición a sistémica) en la articulación artrítica se refiere en particular a administración local de los viriones rAAV *in vivo* o *ex vivo* en la sinovial reumatoide, y en particular, en sinoviocitos. Administración *in vivo*, como se utiliza en este caso, se refiere a la administración directa de los viriones rAAV a la articulación del sujeto, por ejemplo, por inyección intra-articular. Administración *ex vivo* se refiere al aislamiento de células reumatoideas del sujeto, seguida de la administración de los viriones rAAV a las células aisladas cultivadas. Las células transducidas que expresan la proteína terapéutica son luego administradas al sujeto, por, por ejemplo, inyección, reimplantación o reinfusión de células de nuevo en la articulación del sujeto. Administración local puede repetirse después de un número de semanas o meses si es necesario.

[0062] En otra forma de realización, la presente divulgación proporciona un método para entregar una molécula de ácido nucleico a células reumatoideas sinoviales *ex vivo*, el método que incluye las etapas de (a) proporcionar un virión recombinante AAV (rAAV) comprendiendo proteínas cápsidas de serotipo AAV 2 o más preferiblemente de serotipo AAV 5, donde el virión rAAV comprende un vector rAAVX, el vector rAAVX comprendiendo un elemento de expresión operativamente unido a una secuencia de ácidos nucleicos; (b) administrar el virión rAAV para células sinoviales, o cultivos de células comprendiendo células sinoviales, por lo cual transducción produce expresión de la molécula de ácido nucleico en las células transducidas; (c) opcionalmente, seleccionar las células transducidas. Las células transducidas o células comprendiendo las células transducidas se deben administrar a la articulación reumatoide de un sujeto.

[0063] Selección o enriquecimiento de las células transducidas antes de readministración a la articulación donde las células originadas pueden hacerse usando métodos conocidos. El sujeto a partir del cual las células o cultivos de células se obtienen en la fase (b) no necesita ser el mismo sujeto al que las células transducidas se readministran en la fase (d), es decir, las células pueden ser autólogas (del mismo sujeto) o no autólogas (de un sujeto diferente).

[0064] Los viriones rAAV5 de la invención pueden también ser formulados en composiciones farmacéuticas, de modo que en vez de administrar los viriones rAAV directamente a la articulación, la composición farmacéutica se administra localmente *in vivo*, por ejemplo, por inyección o microinyección. La composición farmacéutica comprende viriones rAAV suficientes y excipientes adicionales farmacéuticamente aceptables, tales como, pero no limitado a, agua, solución salina, glicerol o etanol. Sustancia adicional puede estar presente, tal como emulsionantes, agentes de humidificación, tampones y similares.

[0065] La invención proporciona un virión rAAV comprendiendo proteínas cápsidas de serotipo AAV 5, por lo cual el virión rAAV comprende un vector rAAV2 comprendiendo un elemento de expresión operativamente unido a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína terapéutica eficaz contra la artritis reumatoide.

[0066] Estos viriones rAAV, una célula sinovial transducida con estos y/o composiciones farmacéuticas comprendiendo bien dichos viriones o dichas células son para uso en el tratamiento de artritis reumatoide, como se describe en las reivindicaciones anexas.

[0067] Los viriones rAAV anteriormente descritos pueden también ser administrados *in vitro* a células sinoviales o cultivos de células; las células transducidas son luego seleccionadas opcionalmente.

[0068] En otro aspecto, la invención se refiere al uso de un virión tal como se ha definido anteriormente para la producción de un medicamento para el tratamiento de una articulación reumatoide como se describe en las reivindicaciones anexas.

[0069] La "sinovial", "tejido sinovial" o "células sinoviales", como se utiliza en este caso, se refiere al revestimiento celular que recubre las superficies no cartilaginosas de las articulaciones sinoviales, como además se describe en Tak (2000, *Examination of the synovium and synovial fluid*. En: Firestein GS, Panyani GS, Wollheim FA editors. *Rheumatoid Arthritis*. New York: Oxford Univ.

[0070] *Press, Inc.* 55-68). La sinovial consiste en el estrato de revestimiento íntimo (o estrato de revestimiento sinovial) y la sublimación sinovial (subsinoval), que se incorpora con la cápsula de articulación. El estrato de revestimiento íntimo comprende macrófagos íntimos (o sinoviocitos tipo macrófago o sinoviocitos tipo A) y sinoviocitos tipo fibroblasto (o sinoviocitos tipo B). Los términos "sinovial reumatoide" o "células sinoviales reumatoides" o "tejido sinovial reumatoide" se refieren a la sinovial inflamada de las articulaciones de un sujeto que sufre artritis reumatoide. La sinovial reumatoide se caracteriza por el hecho de hiperplasia de revestimiento íntima y por acumulación de células T, células de plasma, macrófagos, células B, células asesinas naturales y células dendríticas en el subrevestimiento sinovial. Estas células acumuladas están comprendidas en la definición de células reumatoides sinoviales.

[0071] En otra forma de realización, la descripción se refiere a un virión rAAV comprendiendo proteínas cápsidas de serotipo AAV 5 o serotipo AAV 2, por lo cual el virión rAAV comprende un vector rAAVX, donde el vector rAAVX comprende un elemento de expresión operativamente unido a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína terapéutica eficaz contra la artritis reumatoide. Más preferiblemente, el virión rAAV es un virión rAAV5, comprendiendo AAV5 proteínas cápsidas, y donde el vector rAAVX es un vector rAAV5 o rAAV2, de los cuales un vector rAAV2 es más preferido. La secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína terapéutica eficaz contra la artritis reumatoide es preferiblemente como se ha descrito anteriormente y el vector puede comprender además un gen suicida como se ha descrito anteriormente.

[0072] En otra forma de realización de esta descripción, un virión rAAV5 comprendiendo un vector rAAVX se provee, donde el vector rAAVX comprende un elemento regulador de expresión operativamente unido a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína terapéutica eficaz contra la artritis reumatoide, y donde el virión rAAV5 tiene una eficacia de transducción para células sinoviales que es superior a la de viriones rAAV2. La eficacia de transducción es preferiblemente al menos sobre dos veces como alta, más preferiblemente al menos aproximadamente 2,5 veces como alta, o incluso aproximadamente 3 veces como alta. Eficiencia de transducción se puede evaluar en *in vivo* o *in vitro* (células sinoviales cultivadas), transduciendo las células y evaluando la transducción usando métodos estándar. Eficacia de transducción se puede evaluar, por ejemplo, como se muestra en los ejemplos. Preferiblemente, un indicador detectable o gen marcador está presente en los vectores rAAV cuando se evalúa la eficacia de transducción.

[0073] También aquí se describe equipos comprendiendo uno o más de los componentes requeridos para la realización de los métodos de la invención, tal como, por ejemplo, un equipo comprendiendo uno o más vectores rAAVX, viriones rAAV, protocolos, reactivos y similares.

[0074] A menos que se declare de otra manera, la práctica de la invención empleará métodos convencionales estándar de biología molecular, virología, microbiología o bioquímica. Tales técnicas se describen en Sambrook and Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY*, en los volúmenes 1 y 2 de Ausubel *et al.* (1994) *Current Protocols in Molecular Biology, Current Protocols, USA* y en los volúmenes I y II de Brown (1998) *Molecular Biology LabFax, Second Edition, Academic Press (UK), Oligonucleotide Synthesis (N. Gait edit o), Nucleic Acid Hybridization (Hames and Higgins, eds.), CRC Handbook of Parvovirus uses vol I and II (P. Tijessen ed.), Fundamental Virology 2nd Edition, vol. I and II (Fields and Knipe eds.)*

[0075] Los siguientes ejemplos no limitativos describen la identificación de los métodos y vectores de la invención.

## Ejemplos

### Ejemplo 1 - producción de viriones AAV recombinantes

[0076] Viriones rAAV1 a rAAV5 fueron producidos esencialmente como se describe por Grimm *et al.* (2002; *Methods* 28: 146-15), con referencia particular al método como se resume en la tabla 2 y la figura 2 de este documento (nótese que referencia 21 en Grimm *et al.*, 2002, *supra*, ha sido publicado ahora como Grimm *et al.*, 2003, *Mol. Therapy* 7: 839-850). Para la producción de los viriones rAAV el denominado método dos-plásmidos descrito en estos documentos de Grimm *et al.* fue usado. Plásmidos auxiliares y de expresión fueron básicamente como se describe en estos dos documentos por Grimm *et al.* (2002, 2003 *supra*), por lo cual el plásmido auxiliar contiene el esqueleto vírico que incluye las proteínas cápsidas que determinan el serotipo del virión. Un plásmido de expresión particular usado en la presente invención es pVD11, en el que un casete de expresión lacZ se flanquea por AAV2 ITR.

[0077] pVD11 fue construido empezando a partir de pTRUF-2, que es descrito por Zolotukhin *et al.* (1996, *J. Virol.* 70: 4646-4654) y en el que el elemento de regulación postranscripcional de virus de hepatitis de marmota de América (WPRE) fue insertado para mejorar la expresión del gen indicador (Xu *et al.*, 2003, *Biochim Biophys Acta.* 11; 1621:266-71) y en el cual el gen indicador de GFP fue sustituido por el gen lacZ de *E. coli* como gen indicador.

[0078] Como ejemplo, la producción de viriones AAV5 con pVD11 fue de la siguiente manera: 293 células cultivadas en las botellas de rodillo fueron modificadas con plásmido auxiliar pDP5 AAV y plásmido pVD11 usando el método de fosfato de calcio (ver, por ejemplo, Sambrook and Russell, 2001, *supra*, for calcium phosphate transfection). Células fueron recogidas después de 3 días. Células fueron lisadas y viriones fueron purificados del lisado celular usando gradientes de iodixanol como se describe por Zolotukhin *et al.* (1999, *Gene Ther.* 6: 973-85). Iodixanol fue

posteriormente quitado y viriones fueron además concentrados usando diafiltración. El mismo procedimiento fue usado para la producción de viriones AAV-1; -2; -3, y -4 usando los plásmido auxiliares de determinación de serotipo adecuado como descrito en Grimm et al. (2002, *supra*).

## 5 Ejemplo 2 - entrega de gen *in vivo* a ratas y ratones

### A. Ratas

10 [0079] Viriones rAAV1 a rAAV2, con vector pVD11 (u otros vectores rAAV1 a rAAV5, no mostrado) comprendiendo la codificación de gen para beta-galactosidasa fueron inyectados en las articulaciones de tobillo adecuadas de ratas con artritis adyuvante (AA) en el día 12 después de inmunización adyuvante. Articulaciones fueron recogidas después de 2 semanas y analizadas para expresión de beta-galactosidasa por coloración directa *in situ* de secciones congeladas (Fig. 2), cuantificadas por análisis de imagen digital (Fig. 1), y RT-PCR.

15 [0080] Dos semanas después de inyección de vectores AAV-beta-GAL el número de beta-galactosidasa de expresión de células en el tejido sinovial fue evaluado. En articulaciones artríticas inyectadas con viriones rAAV2, un alto número de células expresó beta-galactosidasa (111,441 IOD/mm<sup>2</sup>), mientras en articulaciones artríticas inyectadas con viriones rAAV2 solo 38,212 IOD/mm<sup>2</sup> células fueron contadas (Fig. 1). Ninguna expresión de coloración de fondo arriba fue observada para vectores derivados de serotipos AAV1, AAV3 y AAV4. Expresión del transgen fue confirmada por  
20 análisis de las articulaciones por PCR semi-cuantitativo (datos no mostrados).

### B. Ratones

25 [0081] En los viriones rAAV de artritis inducida por colágeno (CIA) de ratones comprendiendo vectores rAAV 1, rAAV2 y rAAV5 con el gen mSEAP fueron localmente inyectados en la articulación de la rodilla izquierda 32 días después de la inducción de artritis. Expresión de transgen fue analizada por RT-PCR en varios órganos para biodistribución, y por Elisa en sueros y medio de cultivo añadido por los tejidos de articulación en puntos de tiempo diferentes.

30 [0082] En los ratones de CIA viriones rAAV5 también proporcionaron una eficiencia de transducción muy alta. Expresión de transgen fue detectable en sueros y rótulas una semana después de inyección en la articulación, aumentado extraordinario y estabilizado para a menos un mes (5,31 ± 1,59 y 1,94 ± 1,97 ng/ml, respectivamente). Ninguna expresión detectable fue encontrada para vectores basados en serotipos AAV1 y AAV2.

### Conclusiones

35 [0083] Sorprendentemente se descubrió que eficacia de transducción de vectores basada en diferentes viriones de serotipo AAV en modelos experimentales de artritis reumatoide variaba considerablemente, que varía de ser completamente inefectivos a tener una eficiencia de transducción muy alta (para vectores contenidos en viriones AAV5). Los ejemplos claramente demuestran que transferencia *in vivo* de gen con viriones AAV5 fue mucho más eficaz que con  
40 los otros serotipos y que virión rAAV5 es particularmente adecuado para terapia genética *in vivo* de artritis reumatoide.

## Ejemplo 3 - artritis inducida por colágeno en ratones

### Materiales y métodos:

45 *Vectores AAV-2/2 y AAV-2/5 recombinantes.*

[0084] Producción de rAAV pseudotipados (ITR tipo 2 basado en genoma AAV recombinante empaquetado en AAV1, AAV2 o AAV5 cápsida) se consiguió por transfección transitoria como se describe por Allen, J.M *et al.* (*Mol Ther*,  
50 *2000,1, 88*) con las siguientes modificaciones. 293 células de riñón humanas embrionarias fueron modificadas con el plásmido auxiliar de adenovirus pXX6, el vector pAAV2 de plásmido pGG2-CMV-muSEAP, que codifica a una forma segregada de la fosfatasa alcalina de murina bajo el control transcripcional de promotor IE CMV y el plásmido de empaquetamiento apropiado AAV, que expresan los genes de rep y cap. Los plásmidos de empaquetamiento son pACG2.1 a rAAV2 y pLT-RC02 para rAAV-1/2 donde el gen AAV2 rep se funden con gen AAV1 de gap (una especie de donación de R. Mulligan). El plásmido de empaquetamiento fue dividido en dos para la producción de rAAV 2/5 (pMTRep2 codificación AAV2 proteínas representantes, una especie de donación de D. Miller y pAAV5svori expresión AAV5 proteínas de rep y cap, una especie de donación de J. Chiorini, requiriendo un paso de transfección cuádruple. Vectores recombinantes fueron purificados por doble gradiente CsCl2 de ultracentrifugado seguido de diálisis extensiva  
55 contra estéril PBS. Partículas físicas fueron cuantificadas por hibridación de transferencia en mancha contra un intervalo de plásmido estándar. Títulos se expresan como genoma vírico por ml (vg/ml). Los títulos rAAV 2/1-mSEAP, rAAV-2/5-mSEAP y rAAV-2/2-mSEAP fueron respectivamente 1,6 x 10<sup>12</sup>, 2,9 x 10<sup>12</sup> y 2,7 x 10<sup>11</sup> vg/ml. Los plásmidos rAAV-2/2 y -2/5 que expresan el transgen β-Gal bajo el promotor CMV fueron flanqueados por el AAV-2 ITR y encapsulados respectivamente en una cubierta AAV-2 o AAV-5. Partículas víricas fueron producidas por transfección doble en 293  
60 células tal y como se describe anteriormente por Grimm, D. (*Hum Gene Ther*, 1998,9, 2745), purificadas respectivamente usando una columna de iodixinol heparina o un gradiente CsCl doble, y dializadas contra PBS por el núcleo de vector del Hospital Universitario de Nantes. Los títulos rAAV fueron determinados por transferencia en

mancha y expresados como genoma de vector por ml (vg/ml). Estos fueron respectivamente 1,8 x 10<sup>11</sup> y 3 x 10<sup>12</sup> vg/ml para rAAV-2/2 y -2/5.

#### Estudios animales

5 [0085] Ratones DBA/1 macho (Harlan, Francia) fueron criados en nuestras instalaciones y usados a la edad de 8-10 semanas. Artritis inducida de colágeno (CIA) fue inducida por inyección intradérmica a la base de la cola con 100 µl de solución de colágeno a 1 µg/µl el día 0. Colágeno tipo bovino II (bCII) fue diluido en 2 mg/ml (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, Francia) con ácido acético 50 mM, y emulsionado con un volumen igual de adyuvante completo de Freund (Pierce, Bezons, Francia) antes de uso. El día 21, animales fueron estimulados con una inyección intradérmica de 100 µl de solución bCII emulsionada con un volumen igual de adyuvante incompleto de Freund (Pierce, Bezons, Francia) antes de uso. Después de la inducción de artritis espesor de pata fue medido sobre tiempo con un micrómetro Mitutoyo (Sigma). El día 28, ratones fueron sincronizados con inyección intraperitoneal de 40µg (Sigma) LPS. Cuando señales clínicas de artritis aparecieron, los ratones fueron anestesiados por inyección intraperitoneal de una solución de quetamina (30 mg /Kg) y xilazina (10 mg/Kg). La piel sobre la rodilla fue afeitada, y dosis indicadas de serotipos AAV fueron inyectadas intraarticularmente en 5 µl de 0,9% NaCl en la articulación de la rodilla izquierda, usando una jeringa de Hamilton con un agujero 30-gauge (NH-BIO, Massy, Francia). El día del sacrificio, articulaciones de rodilla enteras fueron recogidas y congeladas en nitrógeno líquido para cuantificación in situ de coloración β-Gal en secciones congeladas. En experimentos que usan el gen indicador mSEAP, muestras de sangre fueron tomadas a varios momentos antes y después de inyección de vector, y almacenadas a -20°C hasta evaluación. El día del sacrificio, rótulas izquierda y derecha fueron recogidas e incubadas 24hrs en RPMI (200 µl). Sobrenadantes fueron almacenados a -20°C y rótulas fueron almacenadas en nitrógeno líquido hasta evaluación.

#### *Coloración in situ para expresión de transgen de β-galactosidasa*

25 [0086] Rótulas fueron colocadas en compuesto de temperatura de corte óptima (OCT) e inmediatamente congeladas en el hielo seco. Muestras fueron cortadas en un criostato y secciones de tejido fijo en 1,25% glutaraldehído durante 10 min, enjuagadas 3 veces en PBS, colocadas durante toda la noche a 37°C en la solución X-Gal. Portaobjetos fueron luego lavados 3 veces en PBS y contratados con él.

#### *Cuantificación de suero muSeAP*

35 [0087] Muestras de sangre fueron recogidas en los puntos de tiempo indicados después de la administración del vector. Detección quimioluminiscente permitió cuantificación de actividad enzimática. Brevemente, muestras fueron centrifugadas durante 5 minutos a 2500 g para recopilar sueros, fosfatos endógenos alcalinos fueron inactivados por calor 5 min a 65°C y el resistente al calor muSeAP fue medido por la adición de tampón de reacción y sustrato quimioluminiscente CPSD según las instrucciones del fabricante (Tropix). Quimioluminiscencia fue cuantificada en un luminómetro (Mediators Diagnostika). Niveles de expresión se expresan como ng de muSeAP por ml de suero según una curva estándar de fosfatasa alcalina de placenta humana purificada.

#### Resultados

#### *Entrega intra-articular de serotipos rAAV en articulaciones de ratones*

45 [0088] Para comparar la eficiencia de transducción de serotipos AAV en las articulaciones, entregamos 5 x 10<sup>8</sup> partículas de AAV-2/1, AAV-2/2 y AAV2-2/5 expresión β-Gal o mSEAP por inyección directa en las articulaciones de ratones DBA/1 después de aparición de artritis. Rótulas fueron recogidas a 4 semanas para coloración X-gal e inmunohistoquímica, o para detección quimioluminiscente de mSEAP en el medio de cultivo añadido por los tejidos de articulación.

50 [0089] Expresión de LacZ significativa fue detectada en las articulaciones de ratones inyectados con ambos AAV-2/2- y AAV-2/5-LacZ, 4 semanas después de la inyección de vectores, con una eficiencia de transducción significativamente más alta observada con AAV-2/5. Ninguna coloración podría observarse en secciones congeladas de rótulas de rodillas inyectadas con AAV-1/5 o en la rodilla contra-lateral no inyectada. El modelo de expresión fue similar al que previamente se proporcionó, aunque una coloración moderada fue observada en el tejido de revestimiento sinovial, coloración intensa fue revelado en la bolsa suprapatelar. La coloración fue cuantificada por análisis de imagen digital y mostró que la eficiencia de transducción de AAV-2/5-LacZ fue 3 veces superior a AAV-2/2-LacZ. Cuando se usa un gen indicador segregado tal como el mSEAP, expresión de transgen local fue 2 veces más alta con AAV-2/5 que con AAV 2/1 o AAV2-2/2 y aumentó en las articulaciones artríticas, comparado con ratones no artríticos. Así, cápsida AAV de serotipo 5 parece más eficaz para transducir tejidos intra-articulares que los serotipos 1 o 2.

#### *Respuesta a dosis de AAV-2/5*

65 [0090] Después entregamos dosis en aumento de AAV2-2/2 o AAV-2/5 que expresa β-Gal o mSEAP (5 x 10<sup>8</sup>, 1, 5 x 10<sup>9</sup> y 5 x 10<sup>9</sup> partículas) para determinar si la mejor eficiencia observada con AAV2-2/5 sigue siendo real usando dosis más altas en articulaciones artríticas. Cuatro semanas después de la entrega de gen, rótulas fueron recogidas para

coloración X-gal e inmunohistoquímica, o detección quimioluminiscente de mSEAP en el medio de cultivo acondicionado por los tejidos de articulación y en sueros. Dosis en aumento de AAV-2/5 dieron lugar a niveles aumentados de expresión LacZ en la articulación de ratones. Cuando se usa mSEAP como gen indicador, secreción de transgen local fue 2,6 veces más alta con 3 veces más partículas inyectadas, mientras este no era modificado con otras cápsidas evaluadas. No sorprendentemente, el transgen segregado podría también ser detectado en sueros y el mismo intervalo de aumento en niveles de expresión fue observado usando dosis en aumento de virus. La dosis máxima de vector AAV-2/5-mSEAP evaluado fue limitada por la graduación de la preparación vírica y el volumen máximo que podría ser inyectado en articulaciones de ratones (5  $\mu$ l). Es posible que dosis más altas de AAV-2/5 ( $> 5 \times 10^9$  partículas) pueden suponer niveles incluso superiores de expresión de transgen por articulaciones artríticas.

#### *Cinética de expresión para AAV-2/5*

[0091] Luego investigamos si la eficiencia máxima de AAV-2/5 comparada con AAV-2/2 para transducción fue debido a expresión de transgen más lenta. Así, inyectamos  $1,5 \times 10^9$  partículas de AAV-2/1, AAV-2/2 y AAV-2/5 que expresa un gen indicador segregado mSEAP en las articulaciones artríticas de ratones DBA/1 y se recogieron muestras de sangre en los puntos de tiempo indicados. En animales inyectados AAV-2/5-mSEAP, expresión de transgen aumentó gradualmente a partir de 7 días después de administración para alcanzar un nivel máximo a 3 semanas. Al contrario, AAV-2/1- y AAV-2/2-mSEAP fueron débilmente detectados a 3 y 4 semanas respectivamente. En un segundo experimento, mostramos que expresión de transgen se mantuvo estable durante al menos 19 semanas usando AAV-2/5-mSEAP, mientras AAV-2/1-mSEAP dio una expresión transitoria del transgen sobre 6 semanas, y no mostró ninguna expresión de transgen AAV-2/2-mSEAP sistémica detectable.

#### Ejemplo 4 - Artritis inducida por adjuvantes en ratas

##### Materiales y métodos

##### *Construcción de AA V recombinante*

[0092] Todos los constructos rAAV fueron derivados de AAV2 y conducidos por el promotor citomegalovirus (CMV). AAV recombinante fue producido por co-transfección de células 293 HEK con un plásmido de empaquetamiento (pDG para AAV2 y pDP1, pDP3, pDP4 y pDP5 para AAV1, AAV3, AAV4 y AAV5, respectivamente) y un plásmido de vector (pVD11) por el método de fosfato cálcico. Los plásmidos de empaquetamiento contuvieron todos los elementos que actúan en trans: genes Cap, genes Rep y genes adenovirales auxiliares. El plásmido de vector contuvo todos los elementos que actúan en cis: ITR, transgen y promotor CMV.

[0093] Células fueron sembradas a una densidad de  $3 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> cuatro días antes de transfección en 850 cm<sup>2</sup> frascos rotativos y fueron crecidas en 50 ml de Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) con glutamax-I (Invitrogen), 10 % (v/v) de suero bovino fetal (FBS) (JRH), 60 U/ml de penicilina/estreptomicina (PS) (Invitrogen) a 37 °C. Antes de transfección, el medio fue sustituido con Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMAM; Invitrogen) y a 16 h post transfección el medio fue sustituido con 50 ml de DMEM/FBS/PS fresco. A 72 h de post transfección, las células fueron recogidas en 10 ml 50 mM de Tris-HCl pH 8,5, 150 mM de NaCl, 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,1 % (v/v) de Tritón X-100. Finalmente, benzonasa (Merck) se añadió al lisado a una concentración final de 75 U/ml.

[0094] Lisados de célula crudos fueron además purificados con gradientes de iodixanol. Gradientes de paso de iodixanol fueron hechos en tubos Beckman Quick-seal (25x89 mm, Beckman). Gradientes de paso fueron cargados colocando una pipeta de Pasteurs en el tubo. De arriba a abajo: 15 ml de lisado de célula cruda, 9 ml de iodixanol 15% + 1M de NaCl en PBS-MK (PBS + 1 mM de MgCl<sub>2</sub> + 2,5 mM de KCl), 6 ml de iodixanol 25% en PBS-MK, 5 ml de iodixanol 40% en PBS-MK, 5 ml de iodixanol 60% puro. Luego, el tubo fue sellado y centrifugado durante 1 hora a 69.000 r.p.m. 16°C. Después del centrifugado, el paso de iodixanol 40% a partir de los gradientes fue extraído. El 40% iodixanol con solución de virus fue diluido 10 veces con PBS-MK y concentrado a aproximadamente 2 ml con dispositivos de centricon (YM-100, filtro Millipore). Títulos de materia prima que varían entre  $10^{11}$ - $10^{12}$  copias genómicas (GC)/ml se alcanzaron.

##### *Transferencia de gen local*

[0095] Ratas Lewis macho sin patógeno (150-200 g) fueron obtenidas de Harlan Sprague Dawley Inc. (Horst, Países Bajos) y fueron mantenidos en nuestra instalación de animales central. Todas las ratas fueron inmunizadas en la base de la cola con 1 mg de *Mycobacterium tuberculosis* H37RA (Difco, Detroit, MI) en 0,1 ml de aceite mineral en el día 0. Hinchazón de pata se observó normalmente por el día 10-12 y se midió a diario por pletismometría de desplazamiento de agua. Las articulaciones de tobillo adecuadas fueron inyectadas el día 12 después de inmunización en animales anestesiados con isoflurano. La piel fue preparada con etanol y rAAV1 a 5 con el gen para LacZ (además referenciado a como rAAV1 a 5) se inyectó anterolateralmente en la articulación del tobillo adecuada en un volumen total de 50  $\mu$ l de solución salina usando aguja de calibre 31 en una jeringa de vidrio. Los animales fueron inyectados con  $6.1 \times 10^{10}$  de GC's (n=6/grupo). Adenovirus con LacZ (ajustado a  $6.1 \times 10^{10}$  GC/animal) sirvió como un control positivo, mientras que solución salina se usó como control negativo. AAV y ratas inyectadas con solución fueron sacrificadas dos semanas después de inyección intra-articular por inhalación de CO<sub>2</sub>, ratas inyectadas con adenovirus fueron sacrificadas dos días después de inyección. Muestras de suero fueron tomadas por el sangrado de la vena cava.

[0096] Para indagar la expresión de transgen en puntos de tiempo diferentes, un segundo experimento fue realizado usando un lote diferente de rAAV. Animales recibieron una inyección i.a. de  $1.14 \times 10^{10}$  de GC's AAV2 o rAAV5 y fueron sacrificados como se describe una, dos, tres y cuatro semanas después de inyección (n=3). Muestras de suero fueron obtenidas de los todos grupos por sangrado de cola antes de inyección AAV y por punción de vena cava durante sacrificio.

*Detección de productos de transgen*

10 Coloración de Beta gal in situ

[0097] Articulaciones fueron descalcificadas usando EDTA y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido. Diez  $\mu\text{m}$  secciones se cortaron y se montaron sobre portaobjetos de cristal. Detección de  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -gal) fue realizada por coloración X-gal. Brevemente, tejido fue fijado en 0,25% glutaraldehído/4% paraformaldehído durante 10 min a 4°C. Luego, muestras fueron lavadas dos veces con PBS y manchadas en solución de coloración con 1 mg/ml de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactósido), 2 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM de  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ , 5 mM de  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ , y 0,1% Tritón x-100 en PBS durante toda la noche a 37°C. Después de lavado con PBS, secciones fueron contrateñidas con rojo nuclear. Las secciones fueron analizadas por análisis de imagen digital para células  $\beta$ -gal positivas.

20 Análisis de imagen digital

[0098] Cinco campos seleccionados de forma aleatoria dentro de cada sección fueron elegidos para la digitalización de la cantidad de señal positiva. Estas imágenes fueron adquiridas en un microscopio Olympus (Olympus, Tokio, Japón), capturadas usando una vídeo cámara Charged Coupled Device (Sony, Tokio, Japón) y digitalizadas con una tarjeta de digitalizadores de vídeo de color de 16 bit multimedia PV100. En las imágenes de color resultantes el área de coloración positiva y la densidad óptica media (MOD) fueron medidas por un programa macro. El MOD es proporcional a la concentración celular de proteína. La densidad óptica integrada (IOD) es igual al MOD multiplicado por el área de coloración positiva.

30 Detección PCR a tiempo real de LacZ

[0099] Articulaciones de tobillo (cortadas de piel) y órganos fueron congeladas rápidamente en nitrógeno líquido, pulverizadas usando un mortal, y homogenizadas en 1 ml de reactivo de TRIzol (GibcoBRL Life Technologies) usando un homogenizador de tejido. El ARN total fue aislado de la fase acuosa y ADN genómico (gDNA) fue extraído de la fase de fenol-cloroformo según las instrucciones del fabricante. gDNA fue almacenado para análisis Q-PCR. ARN fue disuelto en DEPC-agua y cuantificado por espectrofotometría. ADNc fue sintetizado usando 1  $\mu\text{g}$  de ARN y 0,5  $\mu\text{g}$  de Oligo(dT) (GibcoBRL), 5X First-Strandbuffer, 0,1 M de DTT, mezcla dNTP (10 mM cada una) y 1  $\mu\text{l}$  de Superscript II RT (Invitrogen). Para RT-PCR, 10  $\mu\text{l}$  de solución de ADNc fue amplificada usando 25  $\mu\text{l}$  de AccuPrime SuperMix I (Invitrogen Life technologies), 215 mM del cebador LacZ1 (adelante, 5'- GCA-TCG-AGC-TGG-GTA-ATA-AGC-GTT-GGC-AAT-3') y 215 mM del cebador LacZ2 (inverso, 5'-GAC-ACC-AGA- CCA-ACT-GGT-AAT-GGT-AGC-GAC-3') en un volumen total de 50 $\mu\text{l}$ . Amplificación fue luego realizada en un termociclador (MJ Research, Inc.) de la siguiente manera: 3 min a 95°C seguido de 35 ciclos de 94°C durante 1 min, 58°C durante 90 seg y 72°C durante 1 min, respectivamente, seguidos de una fase de extensión final a 72°C durante 10 minutos. Los productos PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa estándar en un gel de agarosa 0,9% con bromuro de etidio para visualización asistida de UV del producto de 622 pares de bases.

*Detección de copias víricas genómicas por PCR cuantitativo*

[0100] Para determinar la graduación vírica en términos de copias genómicas (partículas completas víricas), muestras AAV fueron diluidas primero 10 veces en PBS. Posteriormente, 5  $\mu\text{l}$  de estas diluciones fueron añadidas por duplicado a 45  $\mu\text{l}$  de 0,25 mg/ml de ADNasa I, PBS. Las mezclas fueron incubadas durante 20 min a 37 °C, después de los cuales 75  $\mu\text{l}$  de 2,75 mg/ml de proteinasa K, 8,6 mM de Tris-HCl pH 8,0, 86 mM de NaCl, 8,6 mM de EDTA, 0,43 % (p/v) SDS fue añadido. Tras la incubación durante 60 min a 37 °C, 115  $\mu\text{l}$  de 14  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de poliA, SV ARN lysisbuffer (Promega) se añadió por pocillo. Muestras fueron incubadas con 10  $\mu\text{l}$  de suspensión de MagneSil BLUE (Promega) y el ADN vírico fue aislado usando el dispositivo de separación magnética MagnaBot 96 (Promega) según las instrucciones del proveedor. Diluciones del ADN vírico purificado o el aislado gDNA de las articulaciones y órganos fueron añadidos para mezcla PCR (0,5  $\mu\text{M}$  de cebador directo CMV (5'AATGGGCGGTAGGCGTGTAA3') (Invitrogen), 0,5  $\mu\text{M}$  de cebador inverso CMV (5'AGGCGATCTGACGGTTCATAA3') (Invitrogen), y tampón de mezcla maestra PCR SYBR verde (Applied Biosystems). Estándares de ADN usados fueron diluciones en serie de 10 pliegues de  $10\text{E}+1$  a  $10\text{E}+8$  copias de pVD23. Reacciones de PCR fueron realizadas usando el sistema de detección de secuencia Abi prism SDS7000 (Applied biosystems).

*Determinación de anticuerpos de neutralización contra rAAV en el suero*

[0101] Títulos de anticuerpos neutralizantes fueron analizados por evaluación de la capacidad de anticuerpo en suero para inhibir la transducción de AAV en células COS. Varias diluciones de suero (1:200 a 1:5200) fueron preincubadas

con rAAV a 37°C durante 1 hora y luego añadidas a 80% de células confluyentes. Luego, cultivos de células fueron incubados con AAV en presencia de suero durante 20 horas y expresión LacZ fue medida por coloración X-gal. La graduación de anticuerpos fue representada por la dilución máxima que no dio ninguna inhibición de expresión de β-gal en comparación con células incubadas solo con AAV.

5

*Cultivo celular de FLS humano*

[0102] Artroscopia de taladro pequeño (2.7mm artroscopio, Storz, Tuttlingen, Alemania) fue realizada bajo anestesia local en pacientes con RA establecida.

10

[0103] Las biopsias obtenidas se dispersaron enzimáticamente. Brevemente, sinovial fue desmenuzada e incubada con 1 mg/ml de colagenasa tipo VIII (Sigma) en DMEM sin suero (Gibco) durante 3 h a 37°C. Luego, células fueron lavadas extensivamente y cultivadas en DMEM / 10% suero de ternero fetal (FCS) en una atmósfera humedecida 5% de CO<sub>2</sub>. A las células se les permitió adherirse durante toda la noche y células no adherentes fueron quitadas. FLS Adherentes crecieron en FCS DMEM/10% y se dividieron 1:3 a 80- 90% de confluencia. Los FLS humanos se usaron de pasaje 3 a 10.

15

*Transducción de gen in vitro en FLS*

20

[0104] FLS fueron colocados en placas de 96 pocillos (Falcon) a 8 x10<sup>3</sup>/pocillo. Tras la incubación durante 10 horas, 8 x10<sup>7</sup> GCs de rAAV2 y rAAV5 con los genes para LacZ o proteína verde fluorescente (GFP) fueron añadidos a cada pocillo en medio con 10%. Las células fueron cultivadas durante 48 horas y expresión de gen marcador fue evaluada por coloración enzimática o microscopía fluorescente. Tres líneas celulares independientes FLS fueron usadas para estos experimentos.

25

Resultados

*Eficiencia comparativa de cinco serotipos AAV*

30

[0105] Para comparar la eficiencia de transducción de serotipos AAV en las articulaciones, rAAV1 a rAAV5 fueron inyectados en las articulaciones de tobillo adecuadas de ratas en el día 12 después de inmunización adyuvante. Articulaciones fueron recogidas dos semanas después de inyección y manchado *in situ* para expresión β-gal. Expresión de transgen fue cuantificada por análisis de imagen digital. La expresión más abundante de β-Gal se observó en articulaciones artríticas inyectadas con rAAV5. Sorprendentemente, transducción AAV dio como resultado una penetración superior en el tejido sinovial en comparación con adenovirus, que muestra expresión β-Gal justo en el revestimiento. En el contralateral no inyectado y articulaciones de control ninguna coloración se pudo observar. Usando análisis de imagen digital el número máximo de expresión de células β-Gal en el tejido sinovial fue detectado en articulaciones artríticas inyectadas con AAV5, seguido por una expresión mucho inferior usando AAV2 (111441 y 38212 IOD/mm<sup>2</sup>, respectivamente). Sin expresión anterior coloración fue observada para serotipo 1, 3 y 4.

40

*Duración de expresión de transgen*

45

[0106] Para estudiar la expresión de transgen en el tiempo, rAAV2 y rAAV5 fueron inyectados en articulaciones artríticas de ratas y sacrificadas una, dos, tres y cuatro semanas después de inyección del vector. Ambos serotipos demostraron una expresión significativa durante hasta cuatro semanas, que ya estuvo presente una semana después de inyección. No obstante, rAAV5 mostró anteriormente y en todo el puntos de tiempo una expresión de β-Gal más alta como cuantificada por análisis de imagen digital (Fig. 4). Articulaciones inyectadas se congelaron rápidamente y criosecciones se mancharon *in situ* para actividad beta-gal. La cantidad de coloración azul por sección fue analizada por análisis de imagen digital y expresada como acumulada 100/mm<sup>2</sup> (IOD: densidad óptica integrada). Esto fue confirmado por análisis Q-PCR. Una cantidad más alta de copias genómicas fue detectada en todos los puntos de tiempo después rAAV5 inyección en comparación con el AAV2 tabla de articulaciones inyectadas 1:

50

Tabla 1: Detección de copias víricas genómicas en articulaciones inyectadas después de inyección i.a. de AAV2 o AAV5. ADN genómico fue aislado de articulaciones de tobillo trituradas 1, 2, 3 y 4 semanas después de inyección de AAV. qPCR fue realizado con cebadores específicos para el promotor CMV. Valores expresados como GC/μg gDNA ± stdev.

	AAV2		AAV 5	
Semana 1	6,45E+04	±2,12E+03	1,42E+07	±3,39E+03
Semana 2	1,83E+03	±5,87E+02	1,37E+06	±5,17E+03
Semana 3	<10 copias		4,37E+06	±2,25E+03

55

[0107] Para detectar transcripción de LacZ en las articulaciones, análisis RT-PCR se efectuó usando cebadores específicos. Encontramos transcripción del transgen en articulaciones inyectadas con rAAV5 en todos los puntos de



tiempo que muestran diferencias mínimas en la intensidad, mientras que la cantidad de ARNM LacZ estuvo por debajo del límite de detección de nuestro ensayo en las articulaciones inyectadas de rAAV2.

*Formación de anticuerpos rAAV*

5

[0108] Para detectar una respuesta inmunitaria humoral posible contra las proteínas cápsidas de rAAV, después de inyección local intra-articular, realizamos un ensayo específico como se describe en la sección de métodos. La presencia de anticuerpos de neutralización antes y después de inyección de rAAV fue determinada en el suero de ratas inyectadas con rAAV2 y 5. Los resultados se muestran en la figura 5. Ratas artríticas fueron inyectadas con  $1,14 \times 10^{10}$  de GC's rAAV2 (A) o rAAV2 (B) en las articulaciones de tobillo adecuadas. Muestras de suero fueron obtenidas 1, 2, 3 y 4 semanas después de inyección. Títulos fueron calculados como la dilución máxima que no muestra ninguna inhibición de células positivas X-gal en comparación con pocillos incubados con rAAVLacZ solo.

10

15

[0109] Antes de inyección, ninguno de los anticuerpos fueron encontrados en cualquiera de las muestras. Una semana después de inyección, anticuerpos neutralizantes fueron detectados, alcanzando un máximo a 2 semanas y lentamente disminuyendo después de 3 semanas. Aunque esta tendencia se ve para ambos serotipos, inyección de rAAV2 induce claramente títulos de anticuerpos neutralizantes más altos en el suero entonces rAAV5, mostrando solo niveles ligeramente arriba de antecedentes. De manera importante, ninguna reactividad cruzada se encontró para los dos serotipos.

20

Ejemplo 5 - Transducción de FLS humano con rAAV2 y AAV5

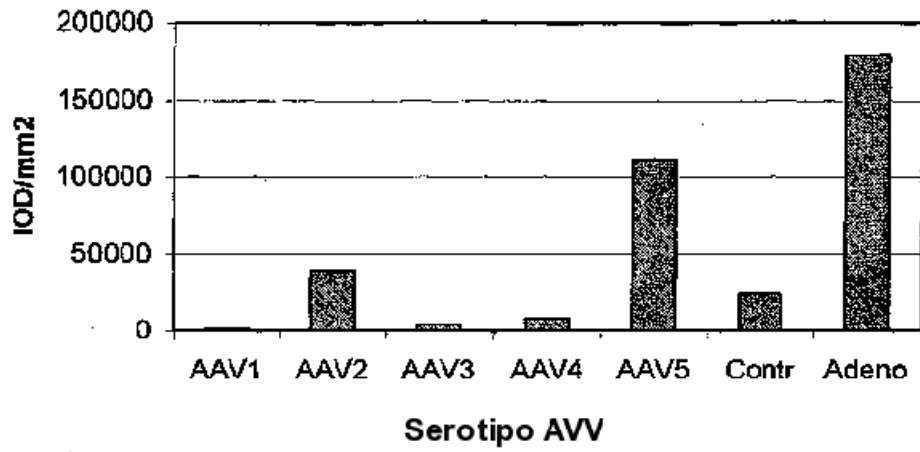
[0110] Habiendo mostrado que rAAV2 y 5 son capaces de transfectar sinovial de rata, queríamos investigar el potencial de ambos serotipos para transducir FLS humano primario obtenido de pacientes con AR. Para este propósito, usamos vectores de LacZ que o bien expresaban rAAV o GFP. Expresión de transgen fue visualizada después de 48 horas por coloración enzimática de  $\beta$ -Gal o microscopía fluorescente. Ambos serotipos fueron capaces de transducir FLS humano, con rAAV5 mostrando una expresión más alta en todos los experimentos. En la figura 6, un experimento representativo es mostrado.

25

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Virión rAAV comprendiendo proteínas cápsidas de serotipo 5 AAV, por el cual el virión rAAV comprende un vector rAAV2 comprendiendo un elemento de expresión operativamente unido a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína terapéutica eficaz contra la artritis reumatoide.
- 10 2. Virión rAAV según la reivindicación 1, donde la secuencia de ácidos nucleicos codifica una proteína terapéutica seleccionada del grupo que consiste en: inhibidor de IL-1, inhibidor de TNF $\alpha$ , antagonista del receptor de IL-1, proteína de enlace de IL-18, receptor de sTNF $\alpha$  p55 o sTNF $\alpha$  p75; dn-IKK-13, IL-4; IL-10; IL-13, IFN- $\beta$  y VIP, y variantes de estos teniendo al menos 80% de identidad de secuencia.
- 15 3. Método *in vitro* para administración de virión rAAV de técnica según la reivindicación 1 o 2 a células sinoviales o cultivos de células comprendiendo células sinoviales *ex vivo*, donde las células transducidas son opcionalmente seleccionadas.
- 20 4. Célula transducida sinovial obtenible por el método según la reivindicación 3.
- 5 5. Composición farmacéuticamente aceptable comprendiendo un virión recombinante AAV tal y como se define en la reivindicación 1 o 2 o una célula sinovial transducida tal y como se define en la reivindicación 4, comprendiendo además un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 25 6. Virión rAAV según la reivindicación 1 o 2 o la célula transducida según la reivindicación 4 o la composición farmacéuticamente aceptable según la reivindicación 5 como un medicamento.
- 30 7. Virión rAAV según la reivindicación 1 o 2 o la célula transducida según la reivindicación 4 o la composición farmacéuticamente aceptable según la reivindicación 5, para uso en el tratamiento de la artritis reumatoide.
- 35 8. Uso de
- a) el virión rAAV según la reivindicación 1 o 2 o
  - b) de la célula transducida según la reivindicación 4 o
  - c) de la composición farmacéuticamente aceptable según la reivindicación 5, para la producción de un medicamento para el tratamiento de la artritis reumatoide.
- 40 9. Uso según la reivindicación 8 a), donde el medicamento es adecuado para la administración a una célula sinovial *in vivo*, por administración local del virión rAAV a una articulación reumatoide de un sujeto.
10. Uso según la reivindicación 8 b) o 9, donde el medicamento es adecuado para la inyección en la articulación, preferiblemente por inyección en el compartimiento sinovial.
11. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, donde expresión de la secuencia de ácidos nucleicos en la célula sinovial transducida produce una reducción de síntomas de artritis de la articulación.
12. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, donde la administración del medicamento se repite después de un cierto periodo de tiempo.

*Fig 1*



*Fig 2*

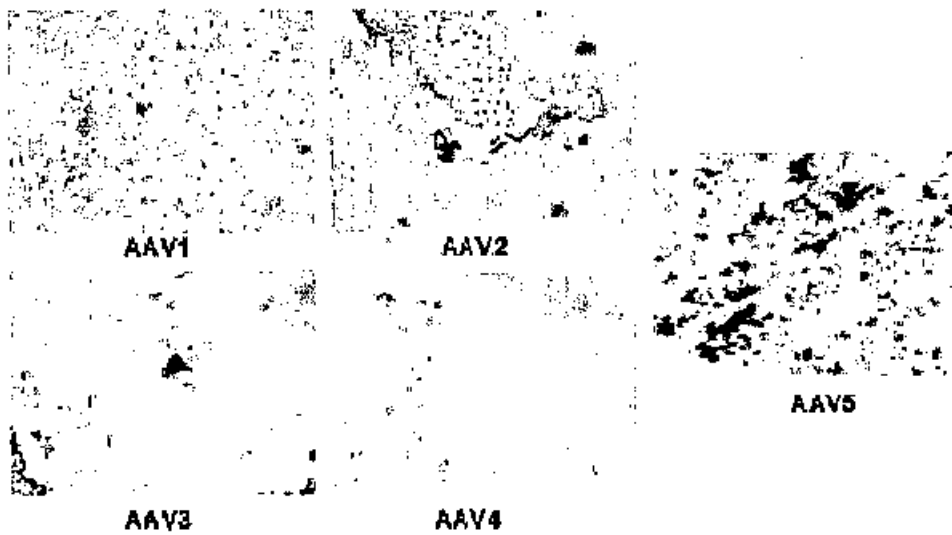
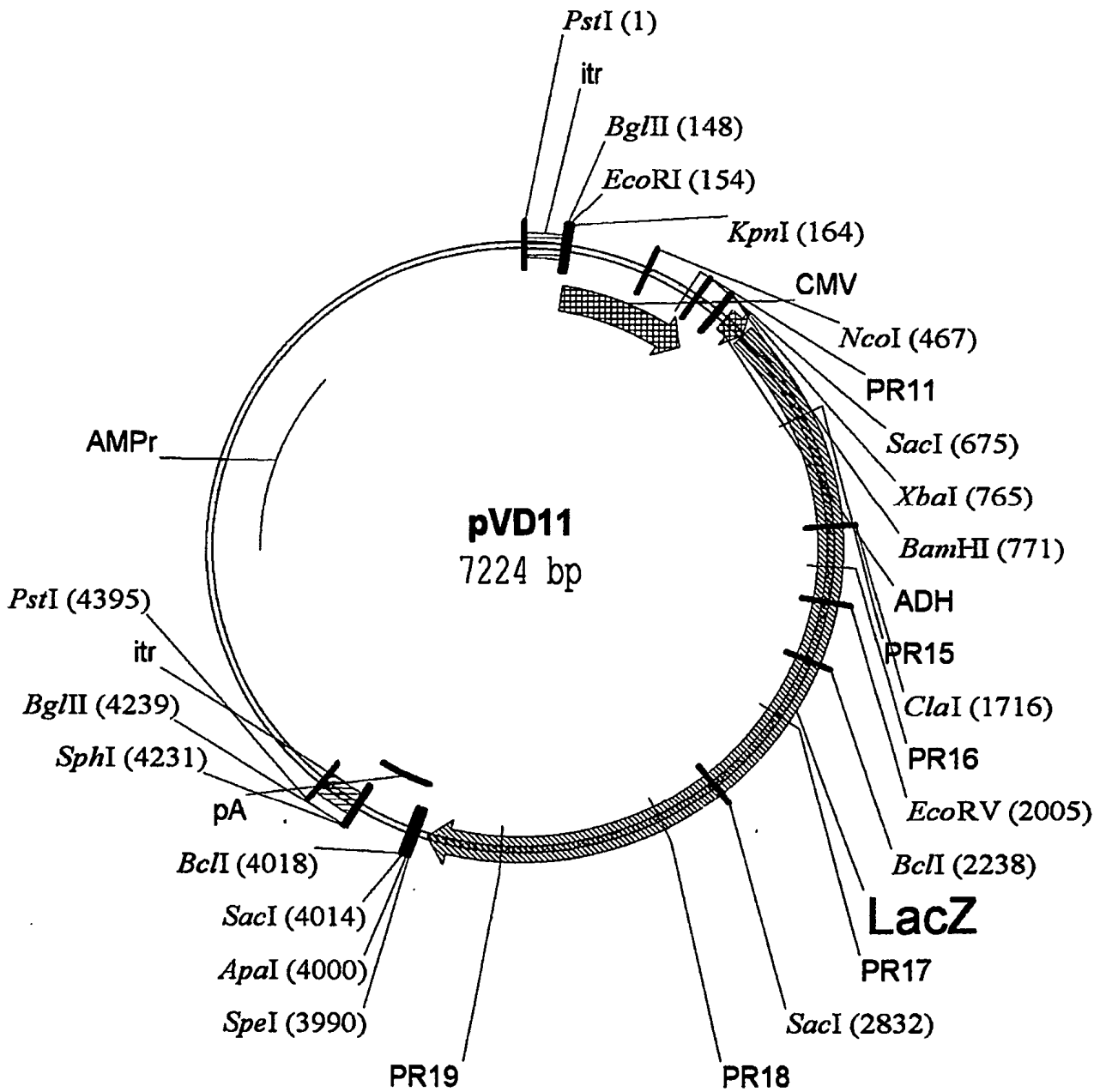
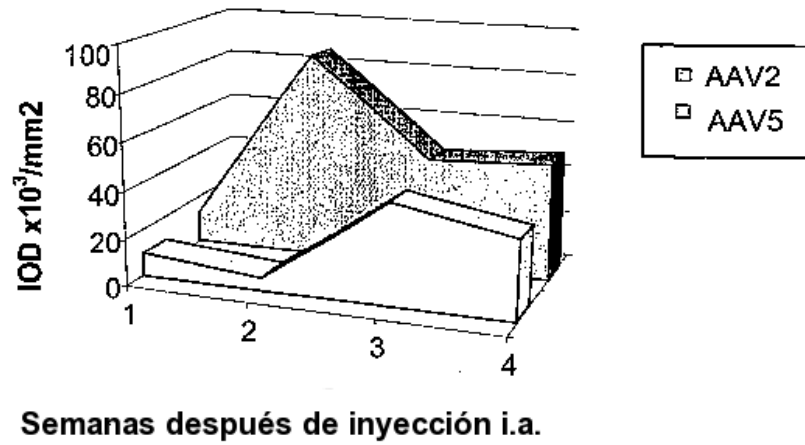


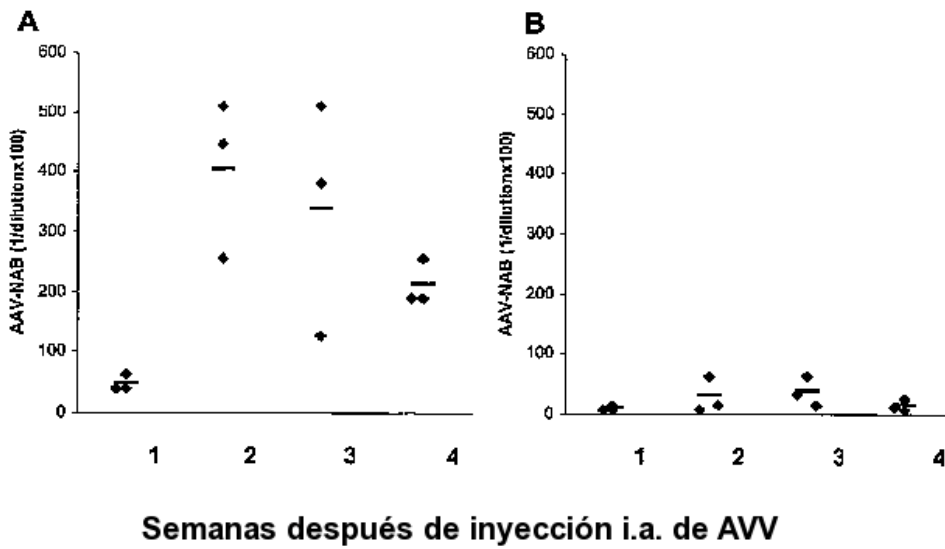
Fig 3



**Fig 4**



**Fig 5**



*Fig 6a*

*Fig 6b*

