

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 467 156**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/33** (2006.01)  
**C12N 15/864** (2006.01)  
**C07K 14/015** (2006.01)  
**A61K 38/00** (2006.01)  
**A61K 48/00** (2006.01)  
**C07K 14/005** (2006.01)  
**C12N 15/86** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2002 E 02787962 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.03.2014 EP 1456383**

54 Título: **Una biblioteca de genes estructurales modificados o de partículas modificadas de cápside útiles para la identificación de clones virales con tropismo celular deseado**

30 Prioridad:

**21.12.2001 US 344131 P**  
**07.03.2002 US 362349 P**  
**30.08.2002 US 407116 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**12.06.2014**

73 Titular/es:

**MEDIGENE AG (100.0%)**  
**LOCHHAMER STRASSE 11**  
**82152 PLANEGG/MARTINSRIED, DE**

72 Inventor/es:

**PERABO, LUCA;**  
**BÜNING, HILDEGARD;**  
**ENSSLE, JÖRG;**  
**RIED, MARTIN;**  
**HALLEK, MICHAEL y**  
**HUTTNER, NADJA**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 467 156 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

Una biblioteca de genes estructurales modificados o de partículas modificadas de cápside útiles para la identificación de clones virales con tropismo celular deseado.

5 La presente invención se refiere a ciertas bibliotecas que contienen genes modificados de la cápside del parvovirus útiles para la identificación de cápsides del parvovirus capaces de transducir tipos de células predefinidos así como a métodos para la producción de los mismos.

10 El control del tropismo del vector (redireccionamiento) representa una preocupación crítica en el desarrollo de sistemas de transferencia de genes virales para terapia génica: para permitir la transferencia eficiente de los genes terapéuticos a las células objetivo y para evitar la transducción de tipos de células no deseadas. Los esfuerzos para lograr estos objetivos condujeron a la descripción de varios enfoques encaminados a proporcionar viriones con la capacidad de interactuar con receptores celulares específicos. Uno de estos enfoques incluye el acoplamiento de partículas virales con moléculas de enlazamiento del receptor, lo que resulta en vectores redireccionados con especificidad mejorada. Una gran desventaja de esta tecnología es, sin embargo, que estas moléculas de redireccionamiento podrían desprenderse de las cápsides, restaurando el tropismo natural de los viriones.

15 Un enfoque diferente consiste en la modificación genética de la cápside viral o de las proteínas de la envoltura mediante mutagénesis dirigida al sitio, principalmente mediante mutagénesis insercional.

20 Para todos estos procedimientos, la etapa crítica es la escogencia de moléculas de redireccionamiento funcionales. Este problema ha sido planteado en varios estudios mediante el aprovechamiento de la tecnología de despliegue en fagos para seleccionar gran número de péptidos por la capacidad deseada de enlazamiento con receptores específicos o tipos de células. Sin embargo, la introducción de moléculas extrañas a nivel de la estructura externa del vector puede perturbar la integridad de las partículas virales, dando como resultado títulos bajos o preparaciones virales ineficientes. Además, estos péptidos ligandos podrían perder completa o parcialmente su afinidad por el receptor pretendido una vez introducidos en la arquitectura del vector. Una solución elegante a este problema ha sido propuesta para los vectores adenovirales (Pereboev A. et al. (2001) *J. Viro* 75 (15), 7107 - 7113). En esta publicación se describe la expresión del botón de fibra de Adenovirus sobre la superficie de fagos pJuFo, lo que permite la visualización de secuencias aleatorias de polipéptidos en un contexto que imita el microambiente del vector de destino. Sin embargo, no se puede superar una limitación fisiológica de las bibliotecas basadas en fagos: las moléculas se pueden seleccionar exclusivamente sobre la base de su capacidad de enlazamiento, mientras que la optimización de la captación y el procesamiento de las partículas virales dentro de la célula no puede llevarse a cabo.

35 Los parvovirus y especialmente el virus adenoasociado (AAV) han recibido una creciente atención como un vector para terapia génica, debido a su falta de patogenicidad, su baja inmunogenicidad, y su capacidad para infectar tanto células en división como aquellas que no se dividen y para facilitar una expresión a largo plazo de los genes terapéuticos. Además, AAV es capaz de integrar un sitio específicamente en el genoma de la célula infectada sin menoscabo de ninguna función celular.

40 Una gran desventaja de la utilización de parvovirus y otros virus en terapia génica es el hecho de que estos virus sólo son capaces de transducir eficientemente tipos específicos de células, mientras que otros tipos de células son resistentes contra una infección por parvovirus. Especialmente, AAV2 sólo es capaz de transducir células que tienen de proteoglicanos de heparán sulfato (HSPG) en su superficie (Girod A. et al. (1999) *Nature Medicine* 5 - 9, 1052 - 1056). Como se mencionó anteriormente, el control del tropismo viral es crucial para la transferencia efectiva de los genes terapéuticos a las células objetivo y para la prevención de una transducción de tipos de células no deseadas.

45 En la publicación Girod A. et al. ((1999) *Nature Medicine* 5 - 9, 1052 - 1056) se ha demostrado recientemente que es posible modificar la estructura externa de un virus adenoasociado con el fin de proporcionarle a la cápside la capacidad de interactuar con receptores celulares que no son reconocidos por el virus de tipo silvestre. Este procedimiento puede llevarse a cabo mediante la inserción de una secuencia de ligando a nivel de un sitio específico de la proteína de la cápside viral, que está presente en la superficie externa de la cápside. Como locus adecuado, se identificó la posición del aminoácido 587 de la proteína principal de la cápside viral (VP1) de AAV2. La inserción en este sitio de la secuencia L14, un péptido que contiene el motivo RGD (una porción del fragmento PI de laminina), proporcionándole al mutante AAV así obtenido (L14-AAV) la capacidad de infectar células B16F10. Las células B16F10 expresan una integrina y son, debido a la falta de expresión de proteoglicanos de heparán sulfato en la membrana celular exterior, resistente a la infección con wtAAV2.

55 Hasta la fecha, no existe un sistema que permite la identificación rápida de virus mutados, especialmente los parvovirus que son capaces de infectar un tipo de célula, pero son incapaces de infectar a otros tipos de células. Tal sistema es muy necesario para la obtención de parvovirus específicos de un tipo de célula para ser utilizados en terapia génica.

En consecuencia, un objetivo de la presente invención es proporcionar sistemas para la identificación de mutantes de AAV, que son capaces de infectar a otros tipos de células a los virus de tipo silvestre correspondientes. Además, un objetivo de la presente invención es proporcionar métodos para la preparación de tales sistemas.

5 La presente invención se refiere por lo tanto, en un primer objetivo a un método para la producción de una biblioteca de ácidos nucleicos que comprenden una multiplicidad superior a  $10^5$  genes estructurales expresables a partir de al menos un virus eucariota, que comprende las etapas de:

a) proporcionar un conjunto de ácidos nucleicos, donde cada uno codifica al menos un gen estructural de un virus eucariota y que comprende una secuencia adecuada de empaquetamiento, en donde el gen estructural contiene un inserto (2) que previene la formación de una proteína estructural funcional, y

10 b) la inserción de un inserto (1) en el gen estructural para remover una secuencia del gen estructural, en donde la secuencia removida comprende o es parte del inserto (2) formando así genes estructurales potencialmente funcionales;

en donde los genes estructurales son genes cap de un virus no empaquetado, y en donde dicho virus no empaquetado es un parvovirus,

15 en donde el virus es AAV y en donde el inserto (1) se inserta después de un ácido nucleico correspondiente a cualquier sitio dentro de los primeros 1 a 50 aminoácidos del terminal amino, o correspondiente a las posiciones e loa aminoácidos 261, 381, 447, 534, 573 y/o 587 de la proteína de la cápside VP1, preferiblemente a la posición del aminoácido 447 o 587, en donde la numeración de los aminoácidos se refiere a la proteína VP1 de AAV2.

20 De acuerdo con la presente invención y divulgación, respectivamente, la expresión "gen estructural" se refiere a un gen que codifica una o más proteínas, preferiblemente proteínas estructurales de una cápside viral ya sea de un virus con envoltura o a un gen que codifica una o más proteínas, preferiblemente proteínas estructurales de una envoltura viral de los virus con envoltura.

La invención se refiere además a una biblioteca de ácidos nucleicos que comprende una multiplicidad de genes estructurales expresables a partir de al menos un AAV, obtenible por el método anterior.

25 La biblioteca de la invención contiene una multiplicidad de ácidos nucleicos con diferentes genes estructurales que pueden expresarse con el fin de formar partículas virales infecciosas con un tropismo para diferentes tipos de células. Dado un cierto tipo de célula, es posible por lo tanto, cribar la biblioteca en busca de AAV mutantes, que son capaces de infectar ese tipo específico de célula.

30 De acuerdo con la invención, el término "proteína de la cápside" significa una proteína codificada por un gen cap, mientras que "proteína funcional de la cápside" significa una proteína de la cápside de un virus capaz de infectar al menos una célula huésped.

En caso de AAV, la proteína de la cápside puede ser VP1, VP2 o VP3, por otros parvovirus pueden diferir los nombres y números de las proteínas de la cápside.

35 De acuerdo con la invención, el término "secuencia de empaquetamiento" significa una secuencia de ácido nucleico que actúa de forma cis que media en el empaquetamiento de un ácido nucleico en una cápside viral. Para los parvovirus, por ejemplo, se sabe en la técnica, que las llamadas "repeticiones terminales invertidas" (ITR) que se localizan en el extremo 5' y 3' del genoma viral lineal tienen esta función.

De acuerdo con la invención, los genes estructurales son genes cap.

40 De acuerdo con otra divulgación e la presente invención, los genes estructurales son genes cap, preferiblemente de virus no envueltos tales como parvovirus o adenovirus. En este caso, los genes cap codifican para una o más proteínas de la cápside.

De acuerdo con la presente invención, la expresión "gen cap" se refiere a un gen que codifica una o más proteínas de una cápside viral, ya sea de un virus sin envoltura o un virus con envoltura.

45 De acuerdo con la presente invención, los genes cap son de un AAV, por ejemplo, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5 o AAV6.

En una realización preferida, la biblioteca que puede ser obtenida por el método de la invención tiene una multiplicidad de mutantes virales que es superior a  $10^5$ , especialmente superior a  $10^6$ . En la presente invención, una

multiplicidad de genes estructurales expresables, es decir genes cap, es superior a  $10^5$ , preferiblemente superior a  $10^6$ .

5 En una realización preferida, el conjunto de ácidos nucleicos se deriva de un ácido nucleico. En este caso, la biblioteca está constituida por una multiplicidad de ácidos nucleicos que son, aparte del inserto, casi idénticos. Sin embargo, también está incluido dentro de la presente invención que el conjunto de ácidos nucleicos se pueda derivar de diferentes ácidos nucleicos que codifican genes estructurales. En este caso, se prefiere que los ácidos nucleicos se deriven de un virus.

10 De acuerdo con una realización preferida, un inserto (1) se inserta en el gen estructural. Sin embargo, también está incluido dentro de la presente invención que se inserten más de un inserto (1). Preferiblemente se insertan dos, tres o hasta seis insertos (1) en el gen estructural. La inserción puede, dependiendo del sitio de la inserción, dar lugar a una inserción de aminoácidos en una o más proteínas estructurales, preferiblemente proteínas de la cápside, por ejemplo, VP1, VP2 y/o VP3 en el caso de AAV. En este contexto, debe tenerse en cuenta que, en el caso de parvovirus, las proteínas de la cápside de parvovirus son codificadas por un solo gen cap mediante la superposición de marcos de lectura.

15 En métodos de la presente invención, se remueve una secuencia del gen estructural mediante la inserción de un inserto (1), en donde la secuencia removida comprende o es parte de un inserto (2) insertado en el gen estructural antes de la etapa (a).

20 Como una forma de realización preferida, el método comprende además una etapa inicial, en la que se modifica el gen estructural para volver el gen estructural no funcional. Esto se puede lograr es decir, mediante la inserción del inserto (2). Por medio del reemplazo de un inserto (2) con el inserto (1) en el método, se formarán genes estructurales potencialmente funcionales. En el caso de parvovirus, esta etapa adicional conduce a un número reducido de viriones de parvovirus que tienen una cápside construida a partir de las proteínas de la cápside viral que no abarcan el inserto (1) y por lo tanto permite la formación de bibliotecas con títulos altos.

25 Como se describe en la etapa a) del método de la invención, el inserto (2) impide la formación de una proteína estructural funcional, es decir una proteína de la cápside. Preferiblemente el inserto (2) contiene un codón de detención. Además, el inserto (2) puede cambiar el marco de lectura abierto o puede introducir aminoácidos adicionales que perturban la formación de cápsides funcionales o su biología de infección en cualquier etapa adicional.

30 En una realización preferida, el inserto (1) y/o el inserto (2) contienen además al menos dos sitios de restricción, preferiblemente uno en su extremo 3' y uno en su extremo 5'.

De acuerdo con una realización preferida, el inserto (2) es al menos parcialmente reemplazado por el inserto (1), por lo que la prevención de la formación de cápsides funcionales es - al menos para algunas cápsides - abolida, en una realización preferida mediante la remoción del codón de detención.

35 De acuerdo con una realización preferida, el número de nucleótidos del inserto (1) y/o del inserto (2), preferentemente del inserto (1) y del inserto (2), es de tres o un múltiplo de tres.

De acuerdo con una realización preferida, el inserto (1) se inserta en una región del gen cap que codifica aminoácidos sobre la superficie de la proteína de la cápside.

De acuerdo con la invención, el inserto (1) se inserta como se describe en las reivindicaciones.

40 En realizaciones preferidas, el virus es AAV2 y el inserto (1) se inserta después de un ácido nucleico correspondiente a un sitio dentro de los primeros aminoácidos 1 a 50 del terminal amino, o correspondiente a las posiciones de los aminoácidos 261, 381, 447, 534, 573, y/o 587 de la proteína de la cápside VP1, preferentemente correspondiente a la posición del aminoácido 447 o 587.

45 En realizaciones preferidas adicionales, el inserto (1) se inserta en ácidos nucleicos correspondientes a los 5 aminoácidos adyacentes de los sitios de inserción indicados anteriormente, ya que estos tramos de aminoácidos representan bucles de la cápside de AAV2 y por lo tanto se localizan en la superficie de la proteína de la cápside. Es posible para la persona capacitada en la técnica identificar los bucles correspondientes y el sitio de inserción para otros parvovirus mediante técnicas conocidas tales como alineación de secuencias, análisis tridimensional de estructuras, plegamiento de proteínas, análisis de hidrofobicidad (Girod A et al, 1999, ver más arriba).

50 Los sitios de inserción especialmente preferidos aquí están dentro de los tramos que consisten de los aminoácidos (aa)

- i) aa 261 - 270, especialmente aa 269,
- ii) aa 324 - 331,
- iii) aa 380 - 383, especialmente aa 381,
- iv) aa 447 - 460, especialmente aa 447 y 451 - 460,
- 5 v) aa 484 - 503, preferentemente aa 484 - 499, especialmente aa 484, 487 o aa 494 - 499,
- vi) aa 507 - 514, especialmente aa 507, 509 o 514,
- vii) aa 527 - 534, especialmente 527 - 529, 532 o 534,
- viii) aa 548 - 556,
- ix) aa 572 - 575, especialmente 573,
- 10 x) aa 581 - 595, especialmente 585, 587, 588 o 594.

La numeración de los aminoácidos se refiere a la proteína VP1 de AAV2 (Girod A et al., 1999, ver más arriba).

Se prefieren especialmente los tramos v) y vi).

- 15 El inserto (1) insertado en el ácido nucleico puede ser idéntico para todos los genes estructurales donde se inserta un inserto (1). Sin embargo, se prefiere que el inserto (1) sea diferente o al menos potencialmente diferente para todos los genes estructurales donde se inserta un inserto (1).

En realizaciones preferidas, el inserto (1) es generado al azar o parcialmente al azar. Esto significa que el inserto (1) introducido en un gen estructural es potencialmente diferente del inserto (1) insertado en otro gen estructural, aunque es teóricamente posible que dos insertos (1) sean idénticos.

- 20 Cuando las secuencias de ácido nucleico insertadas son generadas al azar, en una realización preferida, se utilizan los codones NNN, NNB o NNK (N = A, C, G o T; B = C, G o T; K = G o T). Además, las secuencias de ácido nucleico insertadas pueden ser generadas parcialmente al azar, especialmente usando codones con uno, dos o tres nucleótidos fijos. La longitud de tales inserciones puede ser preferiblemente al menos de 3 nucleótidos, preferiblemente al menos de 9, especialmente al menos de 18 nucleótidos.

- 25 En una realización preferida, el inserto (1) puede contener, además de las secuencias generadas al azar o parcialmente al azar, un tramo adicional de al menos un codón secuencia arriba y/o secuencia abajo de las secuencias de ácido nucleico aleatorias o parcialmente aleatorias, preferiblemente de uno o dos o tres codones que codifican para Ala, Gly, Leu, Ile, Asp y/o Arg, especialmente una inserción de tres codones para Ala secuencia arriba y dos codones para Ala secuencia abajo de las secuencias de ácido nucleico aleatorias o parcialmente aleatorias.

- 30 En una realización preferida, el inserto (1) no contiene ningún codón de detención. Esto se puede lograr por no tener una A o G en la tercera posición de los codones del inserto (1).

Además, la biblioteca que puede ser obtenida por el método de la invención puede tener las características como se define a continuación para la biblioteca de ácidos nucleicos que comprende una multiplicidad de genes estructurales expresables a partir de al menos un virus eucariota.

- 35 En un objetivo adicional, esta invención se refiere a una biblioteca de ácidos nucleicos como se define en las reivindicaciones.

Dicha biblioteca de ácidos nucleicos puede codificar virus eucariotas con una multiplicidad de modificaciones de la estructura externa del virión y/o de la correspondiente información genética (que codifica). La biblioteca tiene una multiplicidad preferida de mutantes virales que es superior a  $10^5$ , especialmente superior a  $10^6$ .

- 40 En la presente invención, la biblioteca de ácidos nucleicos tiene una multiplicidad de genes estructurales expresables, es decir genes cap, que es superior a  $10^5$ , preferiblemente superior a  $10^6$ .

La biblioteca puede estar en la forma de un ácido nucleico lineal, un plásmido, una partícula viral o un vector viral,

por ejemplo, un vector de AAV recombinante.

- 5 En una forma de realización preferida, el ácido nucleico puede comprender adicionalmente secuencias de empaquetamiento (por ejemplo, las ITR de AAV) y genes expresables que proporcionan las funciones necesarias para la replicación y el empaquetamiento de los viriones (por ejemplo, genes no estructurales para parvovirus tales como el gen rep de AAV).

Estas secuencias, genes o funciones pueden proporcionarse en cis (es decir, en el mismo constructo que las secuencias de empaquetamiento y los genes que codifican proteínas de la cápside) o en trans (es decir, en un constructo diferente). Sin embargo, las secuencias de empaquetamiento deben ser proporcionadas en cis.

En una forma de realización preferida, el ácido nucleico es ADN.

- 10 En realizaciones preferidas, las secuencias de empaquetamiento tales como las ITR y los genes que proporcionan las funciones necesarias para la replicación y el empaquetamiento de viriones, tales como el gen rep, se derivan de los parvovirus, preferiblemente de dependovirus tales como AAV o CPV, especialmente de uno de los serotipos de AAV del grupo que comprende AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5 y AAV6 o de parvovirus autónomos, tales como HI, MVM, B19, AAV o GPV.

- 15 Otra realización preferida se refiere a una biblioteca, en la que el gen cap de AAV se deriva del gen cap de AAV codificado en el plásmido pWT99oen (véase la Fig. 1 y el Ejemplo 1).

- 20 La multiplicidad de secuencias de ácido nucleico se insertan en al menos un sitio del gen estructural, es decir el gen cap, en el que el número de nucleótidos insertados es de tres o un múltiplo de tres. De acuerdo con realizaciones preferidas, la multiplicidad de secuencias de ácido nucleico se insertan en uno, dos o tres sitios del gen estructural, preferiblemente el gen cap.

Las secuencias de ácido nucleico insertadas se generan preferentemente al azar, especialmente usando codones NNN, codones NNB o codones NNK (N = A, C, G o T; B = C, G o T; K = G o T). Además, las secuencias de ácido nucleico insertadas pueden ser generadas parcialmente al azar, especialmente usando codones con uno, dos o tres nucleótidos fijos.

- 25 En una forma de realización preferida adicional, un segundo o un inserto adicional (1) puede contener codones no aleatorios para tramos de aminoácidos de elección. Esto tiene la ventaja de que se pueden seleccionar de forma simultánea los genes estructurales que se pueden expresar con una propiedad deseada mediante la inserción de un inserto al azar (1) y uno o más insertos adicionales (1) en diferentes sitios para cambiar las propiedades de tal gen estructural expresable.

- 30 Por ejemplo, si uno ya ha identificado un inserto (1) que codifica para un péptido y conduce a un vector redireccionado o un vector con otras propiedades deseadas, se puede utilizar este inserto en un sitio específico y utilizar un inserto al azar (1) en otro sitio para la selección de un vector con otras propiedades mejoradas. Este procedimiento puede ser repetido para varios o todos los sitios de inserción potenciales conocidos.

- 35 Además, se puede combinar la inserción de un inserto aleatorio (1) con la inserción de insertos fijos adicionales (1) preferentemente en epítomos conocidos o supuestos para cambiar la inmunogenicidad del vector. Dentro del alcance de esta invención se demostró que, o bien mediante el uso de un inserto aleatorio (1) y selección de un vector con un aumento en la infectividad o especificidad para un tipo de célula específico (rAAV-587/Mec, ejemplo 7) o mediante la inserción de un inserto fijo (rAAV-587/L14, ejemplo 7) se pueden suprimir o reducir los efectos neutralizantes de los anticuerpos. Por lo tanto, también se puede utilizar la invención para elaborar o seleccionar los vectores que tienen un enlazamiento reducido con anticuerpos (anticuerpos / sueros monoclonales o policlonales) y/o que tienen la capacidad de escapar de anticuerpos de neutralización y por lo tanto son capaces de escapar de una respuesta inmune en un paciente.

- 40 En una realización preferida, la longitud de dichas inserciones es de al menos 3 nucleótidos, preferiblemente al menos 9, especialmente al menos 18 nucleótidos.

- 45 Las secuencias de ácido nucleico insertadas pueden haber sido insertadas mediante endonucleasas de restricción estándar, sistemas de recombinación, por ejemplo, el sistema de recombinación cre/lox o Gateway o técnicas de reacción en cadena de la polimerasa, por ejemplo, utilizando cebadores degenerados.

- 50 Las secuencias de ácido nucleico insertadas darán lugar a una inserción de aminoácidos en al menos una proteína de la cápside viral, es decir, en el caso de AAV en proteína estructural VP1, VP2 y/o VP3, preferiblemente en un sitio que se encuentra en la superficie de la cápside del virión.

- 5 Las secuencias de ácido nucleico insertadas se pueden insertar en cualquier sitio dentro de los primeros 1 a 50 aminoácidos del terminal amino de VP1, después de las correspondientes posiciones de los aminoácidos 261, 381, 447, 534, 573, y/o 587 de VP1, preferiblemente después de la posición del aminoácido 447 o 587. La numeración de los aminoácidos se refiere a la posición dentro de VP1. Para evitar dudas, los sitios correspondientes de VP2 y VP3, por supuesto tienen un número diferente.
- 10 Para AAV, esto significa que las secuencias de ácido nucleico insertadas pueden ser insertadas después de un ácido nucleico correspondiente en cualquier sitio dentro de los primeros 1 a 50 aminoácidos del terminal amino de VP1, o correspondientes a las posiciones de los aminoácidos 261, 381, 447, 534, 573, y/o 587 de VP1, preferiblemente a la posición del aminoácido 447 o 587. La numeración de los aminoácidos se refiere a la posición dentro de VP1. Para evitar dudas, los sitios correspondientes de VP2 y VP3, por supuesto, tienen un número diferente.
- 15 En realizaciones adicionales aquí, se inserta el inserto (1) en ácidos nucleicos correspondientes al aminoácido adyacente 5 de los sitios de inserción indicados anteriormente, ya que estos tramos de aminoácidos representan bucles de la cápside de AAV2 y por lo tanto se encuentran en la superficie de la proteína de la cápside. Es posible para la persona capacitada en la técnica identificar los bucles correspondientes y el sitio de inserción para otros parvovirus mediante técnicas conocidas tales como alineación de secuencias, análisis estructural tridimensional, plegamiento de proteínas, análisis de hidrofobicidad (Girod A et al., 1999, ver más arriba).
- 20 Los genes cap pueden, de acuerdo con realizaciones preferidas adicionales, tener por lo menos una mutación adicional que sea por ejemplo al menos una mutación puntual, al menos una supresión interna, inserción y/o sustitución de uno o varios aminoácidos o al menos una supresión, inserción y/o sustitución en el terminal N o C de uno o varios aminoácidos, o una combinación de estas mutaciones, preferiblemente una mutación que inhibe el proteoglicano de heparán sulfato, integrinas y/o el enlazamiento del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR). Estas mutaciones específicas adicionales son especialmente ventajosas, ya que reducen la infectividad del virión para un gran número de sus células huésped naturales.
- 25 Tales mutaciones adicionales se pueden usar para una modificación adicional de la infectividad de la proteína / virión Cap, para una reducción de una infección no mediada por AAV, por ejemplo, mediante la reducción o la supresión del enlazamiento para receptores celulares, o para un cambio de inmunogenicidad de la proteína / virión Cap mediante la reducción o la supresión de la afinidad con anticuerpos especialmente que escapan de anticuerpos neutralizantes.
- 30 Además, tales genes cap pueden tener una inserción constante adicional de al menos un codón de secuencia arriba y/o secuencia abajo de los sitios de inserción de las secuencias de ácido nucleico aleatorias, preferiblemente de uno o dos o tres codones que codifican para Ala, Gly, Leu, Ile, Asp y/o Arg, especialmente una inserción de tres Ala secuencia arriba y dos Ala secuencia abajo del sitio de inserción.
- 35 Además, esta invención se refiere a una biblioteca de viriones, es decir viriones AAV, con modificaciones de la proteína de la cápside, como se define en las reivindicaciones.
- En una forma de realización preferida de la invención, la biblioteca de viriones contiene partículas que contienen la información genética necesaria para generar progenie viral.
- Una realización preferida es una biblioteca de dichos viriones, donde cada partícula contiene la información genética necesaria para generar progenie viral.
- 40 En una forma de realización particularmente preferida de la invención, dicha biblioteca de viriones se genera mediante el uso de cualquiera de los ácidos nucleicos mencionados anteriormente.
- 45 Se divulga adicionalmente un gen cap que comprende al menos un sitio de recombinación dentro del gen cap, por ejemplo, mediante el sistema cre/lox o Gateway, preferiblemente después de la posición del aminoácido 587 de VP1 en donde las secuencias de ácido nucleico insertadas se insertan en cualquier sitio dentro de los primeros 1 a 50 aminoácidos del terminal amino de VP1, después de las correspondientes posiciones de los aminoácidos 261, 381, 447, 534, 573, y/o 587 de VP1, preferiblemente después de la posición del aminoácido 447 o 587.
- Los sitios de inserción especialmente preferidos están dentro de los tramos que consisten de los aminoácidos (aa)
- i) aa 261 - 270, especialmente aa 269,
- ii) aa 324 - 331,

- iii) aa 380 - 383, especialmente aa 381,
- iv) aa 447 - 460, especialmente aa 447 y 451 - 460,
- v) aa 484 - 503, preferentemente aa 484 - 499, especialmente aa 484, 487 o aa 494 - 499,
- vi) aa 507 - 514, especialmente aa 507, 509 o 514,
- 5 vii) aa 527 - 534, especialmente 527 - 529, 532 o 534,
- viii) aa 548 - 556,
- ix) aa 572 - 575, especialmente 573,
- x) aa 581 - 595, especialmente 585, 587, 588 o 594.

La numeración de los aminoácidos se refiere a la proteína VP1 de AAV2 (Girod A et al., 1999, ver más arriba).

- 10 Se prefieren especialmente los tramos v) y vi).

Esto significa que una divulgación adicional de esta descripción es un gen cap que comprende al menos un sitio de recombinación dentro del gen cap, preferiblemente para el sistema cre/lox o Gateway. Para AAV, el sitio de recombinación puede ser insertado después de un ácido nucleico correspondiente a cualquier sitio dentro de los primeros 1 a 50 aminoácidos del terminal amino de VP1, o correspondientes a las posiciones de los aminoácidos 261, 381, 447, 534, 573, y/o 587 de VP1, preferiblemente a la posición del aminoácido 447 o 587. La numeración de los aminoácidos se refiere a la posición dentro de VP1. Para evitar dudas, los sitios correspondientes de VP2 y VP3, por supuesto, tienen un número diferente.

- 15

Este gen cap en el contexto de la invención se puede utilizar como material de partida para el método de la invención para producir una biblioteca de parvovirus.

- 20 Además, el gen cap puede comprender al menos un sitio de restricción de endonucleasa o un polienlazador que no está presente en el respectivo sitio del gen de tipo silvestre útil para la inserción en cualquier sitio dentro de los primeros 1 a 50 aminoácidos del terminal amino de VP1, después de las correspondientes posiciones de los aminoácidos 261, 381, 447, 534, 573, y/o 587 de VP1, preferiblemente después de la posición del aminoácido 447 o 587.

- 25 Esto significa que el gen cap puede comprender al menos un sitio de restricción de endonucleasa o un polienlazador que no está presente en el gen respectivo de tipo silvestre. En el caso de AAV2, el sitio de restricción se puede insertar después de un ácido nucleico correspondiente a cualquier sitio dentro de los primeros 1 a 50 aminoácidos del terminal amino de VP1, o correspondiente a las posiciones de los aminoácidos 261, 381, 447, 534, 573, y/o 587 de VP1, preferiblemente a la posición del aminoácido 447 o 587.

- 30 Preferiblemente, el sitio de restricción de la endonucleasa o el polienlazador pueden contener, además, un codón de detención.

Esto proporcionará genes cap que no contienen una inserción con una señal de detención de la traducción que conducirá a proteínas defectuosas de la cápside y, por tanto, no a la producción de virus de tipo silvestre durante la generación de la biblioteca.

- 35 En una realización preferida, el gen cap en el contexto de la invención puede tener además al menos una mutación, preferiblemente al menos una mutación puntual, al menos una supresión, inserción y / o sustitución interna de uno o varios aminoácidos o al menos una supresión, inserción y / o sustitución en el terminal N o C de uno o varios aminoácidos, o una combinación de estas mutaciones.

- 40 Además, tal gen cap puede tener una inserción constante adicional de al menos un codón secuencia arriba y / o secuencia abajo de los sitios de inserción de las secuencias de ácido nucleico aleatorias, preferiblemente de uno o dos o tres codones que codifican para Ala, Gly, Leu, Ile, Asp y/o Arg, especialmente una inserción de tres Ala secuencia arriba y dos Ala secuencia abajo del sitio de inserción.

En una forma de realización preferida adicional, el gen cap puede contener no aleatorios para tramos de aminoácidos de elección. Esto tiene la ventaja de que se pueden seleccionar simultáneamente genes estructurales

expresables con una propiedad deseada mediante la inserción de un inserto al azar y, uno o más insertos adicionales en diferentes sitios para cambiar las propiedades de dicho gen estructural expresable.

5 Por ejemplo, si ya se ha identificado un inserto que codifica para un péptido y conduce a un vector redireccionado o un vector con otras propiedades deseadas, se puede utilizar este inserto en un sitio específico y utilizar un inserto aleatorio en otro sitio para la selección de un vector con otras propiedades mejoradas. Este procedimiento puede ser repetido para varios o todos los sitios de inserción potenciales conocidos.

10 Además, se puede combinar la inserción de un inserto aleatorio con la inserción de insertos fijos adicionales preferiblemente en epítomos conocidos o supuestos para cambiar la inmunogenicidad del vector. Dentro del alcance de esta invención se demostró que, o bien mediante el uso de un inserto aleatorio y la selección de un vector con un aumento en la infectividad o especificidad para un tipo de célula específico (rAAVo-587/Mec, ejemplo 7) o mediante la inserción de un inserto fijo (rAAV-587/L14, ejemplo 7) se puede suprimir o reducir los efectos neutralizantes de los anticuerpos. Por lo tanto, también se puede utilizar la invención para elaborar o seleccionar los vectores que tienen un enlazamiento con anticuerpos (anticuerpos monoclonales o policlonales / sueros) y/o para que tengan la capacidad de escapar de anticuerpos neutralizantes y por lo tanto sean capaces de escapar de una respuesta inmune en un paciente.

Por lo tanto, en una realización más preferida, el gen cap en el contexto de la invención contiene un inserto con

- a) un sitio de restricción o un sitio de recombinación;
- b) uno o más codones que codifican aminoácidos adicionales, preferentemente Ala, Gly, Leu, Ile, Asp y/o Arg; y
- 20 c) un tramo de secuencia que previene la formación de proteínas funcionales de la cápside, preferiblemente un codón de detención.

Se divulga adicionalmente aquí el ácido nucleico que codifica un gen cap con una secuencia del plásmido pWT99oen (Fig. 1, secuencia dada y el Ejemplo 1).

25 Se divulga adicionalmente aquí un ácido nucleico que codifica un gen cap, en el que dicho gen cap tiene una inserción que conduce a aminoácidos adicionales que comprenden un motivo RGD o DDD, preferiblemente un motivo RGDXP o DDDXP, especialmente un motivo RGD que no está presente en proteínas humanas, excluyendo la inserción AGTFALRGDNPQG. Tal gen cap puede tener la inserción correspondiente a RGDXXXX, RGDXPXX, DDXPXX, RGDAVGV o RGDTPTS, GKLFVDR, RDNVVP, GENQARS, RSNGVVP, RSNVVP o NSVRAPP.

La descripción se refiere además a proteínas Cap codificadas por los genes cap anteriores en el contexto de la invención.

30 Otra realización de esta invención involucra un ácido nucleico que codifica un gen cap, en el que dicho gen cap tiene una inserción de la secuencia nucleotídica GANGANNACNNNNCNANNANN (N = A, C, G o T) o una inserción que comprende esa secuencia.

35 Las secuencias de ácido nucleico insertadas se pueden insertar en cualquier sitio correspondiente a los primeros 1 a 50 aminoácidos del terminal amino de VP1, después de las correspondientes posiciones de los aminoácidos 261, 381, 447, 534, 573, y/o 587 de VP1, preferiblemente después de la posición del aminoácido 447 o 587.

Esto significa que en el caso de AAV2, el ácido nucleico en el contexto de la invención puede ser insertado después de un ácido nucleico correspondiente a cualquier sitio dentro de los primeros 1 a 50 aminoácidos del terminal amino de VP1, o correspondientes a las posiciones de los aminoácidos 261, 381, 447, 534, 573, y/o 587 de VP1, preferiblemente a la posición del aminoácido 447 o 587.

40 En una forma de realización preferida, el gen cap del contexto de la invención tiene al menos una mutación que conduce preferiblemente al menos a una mutación puntual, al menos una supresión, inserción y / o sustitución interna de uno o de varios aminoácidos o al menos una supresión, inserción y / o sustitución del terminal N o C de uno o de varios aminoácidos, o una combinación de estas mutaciones.

45 En una forma de realización preferida adicional, tal gen cap puede tener una inserción constante adicional de al menos un codón secuencia arriba y / o secuencia abajo de los sitios de inserción de las secuencias de ácido nucleico aleatorias, preferiblemente de uno o dos o tres codones que codifican para Ala, Gly, Leu, Ile, Asp y / o Arg, especialmente una inserción de tres Ala secuencia arriba y dos Ala secuencia abajo del sitio de inserción.

La descripción se refiere además al uso de un ácido nucleico en el contexto e la invención que codifica un gen cap para la preparación de una biblioteca de ácidos nucleicos que comprende una multiplicidad de genes cap expresables de al menos un virus eucariota, preferiblemente un parvovirus.

5 Además se divulgan aquí constructos de vectores, bacterias o células que comprenden cualquiera de los genes cap o constructos mencionados anteriormente.

Se divulga adicionalmente aquí un método para la selección de un virión recombinante con una mayor infectividad o especificidad por un tipo específico de célula que comprende las etapas de

10 i) proporcionar al menos una primera célula con un constructo de vector que comprende al menos un nucleico ácido a partir de la biblioteca de la invención junto con un segundo ácido nucleico (especialmente secuencias de empaquetamiento tales como las ITR de AAV y uno o más genes que proporcionan funciones no estructurales tales como replicación y empaquetamiento, por ejemplo, las funciones de una proteína Rep de AAV) necesario para el empaquetamiento de un virión;

ii) proporcionar dicha primera célula con las funciones celulares, virales, físicas y / o químicas auxiliares necesarias para el empaquetamiento de viriones de ser necesario;

15 iii) incubar dicha primera célula bajo condiciones adecuadas para el empaquetamiento de viriones y recolectar los viriones producidos por dicha primera célula;

iv) infectar al menos una segunda célula con tales viriones recolectados;

v) proporcionar a dicha segunda célula con las funciones celulares, virales, físicas y / o químicas auxiliares necesarias para el empaquetamiento de un virión;

20 vi) incubar dicha segunda célula bajo condiciones adecuadas para el empaquetamiento de viriones y recolectar los viriones producidos por dicha segunda célula;

mientras que las etapas iv) a vi) puede ser repetidas varias veces.

Las funciones no estructurales como por ejemplo la proteína Rep se pueden proporcionaradas en cis o en trans.

Además, la primera célula y la segunda célula pueden ser de la misma clase o tipo.

25 Se divulga aquí además un método para la selección de un virión recombinante con una mayor infectividad o especificidad por un tipo específico de célula, que al mismo tiempo tiene una infectividad reducida o ninguna infectividad para otro tipo de célula. Para lograr tal selección negativa, el método anterior comprende además, las etapas de

30 vii) infectar al menos una tercera célula (que no se infecta) con los viriones recolectados, mientras que dicha tercera celda no es permisiva para tales viriones, y

viii) recolectar los viriones que no infectaron a dicha tercera célula.

35 Mediante el uso de estas etapas adicionales, los viriones que son capaces de infectar estas terceras células entran en las células, pero no se replican dentro de estas células debido a la no permisividad de las células. Por lo tanto dichos viriones se eliminan de la biblioteca. También se pueden repetir estas etapas en los mismos o en diferentes tipos de células.

40 Las células no permisivas pueden ser obtenidas tanto para los viriones que dependen de un auxiliar como los independientes de un auxiliar al no proporcionar tal tercera célula con todas las funciones celulares, virales, físicas y/o químicas auxiliares necesarias para el empaquetamiento de los viriones. También se puede utilizar fármacos que inhiben la replicación viral y/o en el empaquetamiento, pero no la infección tales como Aciclovir para el VHS. Además se puede utilizar viriones que se han hecho incompetentes a la replicación por mutaciones de manera que una célula tiene que proporcionar una cierta función a ser permisiva de nuevo.

Además, esta invención se refiere a un método para la identificación de un gen cap mutante que conduce a viriones que tienen una mayor infectividad o especificidad por un tipo de célula específica que comprende las etapas anteriores y, además, la etapa de la clonación del ácido nucleico del(de los) gen(es) cap del virión.

5 Preferiblemente, el método para la selección de un virión recombinante incluye además una etapa para la selección adicional de viriones, preferiblemente una etapa de enlazamiento por afinidad de los viriones (por ejemplo, a un receptor conocido o motivo de enlazamiento que puede ser acoplado a perlas o a una resina, por ejemplo mediante cromatografía de afinidad), una etapa de cromatografía de intercambio iónico (para mejorar las posibilidades de purificación de tales viriones) o una etapa de inmunoselección (para eludir potenciales reacciones inmunes de los pacientes, por ejemplo por inmunoagotamiento con anticuerpos).

Preferiblemente además, la descripción se refiere a un método para la selección de un motivo de enlazamiento con un receptor que comprende las etapas como se definió anteriormente, en donde dicha segunda célula es permisiva para el vector respectivo.

10 Tal receptor puede ser expresado de forma recombinante, preferiblemente sobreexpresado mediante tecnologías recombinantes conocidas.

Se divulga además un método para la selección *in vivo* de un virión recombinante capaz de infectar a un tipo específico de célula que comprende las etapas de

15 (i) proporcionar al menos una primera célula con un constructo de vector que comprende al menos un ácido nucleico de la biblioteca descrita anteriormente, junto con secuencias de empaquetamiento, tales como las ITR de AAV y uno o más genes que proporcionan funciones no estructurales necesarias tales como replicación y empaquetamiento, por ejemplo de una proteína Rep de AAV para el empaquetamiento de un virión;

(ii) proporcionarle a dicha primera célula con las funciones auxiliares virales o celulares necesarias para el empaquetamiento de un virión si es necesario;

20 (iii) incubar dicha primera célula bajo condiciones adecuadas para el empaquetamiento de viriones, preferiblemente de AAV, y la recolección de los viriones producidos, preferiblemente de AAV, por esa primera célula;

(iv) infectar un animal con dichos viriones.

25 Este método se puede utilizar para la identificación de un gen cap mutante lo que conduce a viriones que tienen una mayor infectividad o especificidad por un tipo de célula específica mediante la adición de la etapa de clonación del ácido nucleico del(de los) gen(es) cap de dicho tipo de célula del animal.

Se divulga adicionalmente un método para la selección de un virión recombinante con una inmunogenicidad modificada que comprende las etapas de

30 i) proporcionar al menos una primera célula con un constructo de vector que comprende al menos un ácido nucleico de la biblioteca de la invención junto con un segundo ácido nucleico (especialmente secuencias tales como las ITR de AAV y uno o más genes que proporcionan funciones no estructurales tales como replicación y empaquetamiento, por ejemplo funciones de una proteína Rep de AAV) necesario para el empaquetamiento de un virión.

ii) proporcionarle a dicha primera célula las funciones celulares, virales, físicas y / o químicas auxiliares necesarias para el empaquetamiento de viriones de ser necesario;

35 iii) incubar dicha primera célula bajo condiciones adecuadas para el empaquetamiento de viriones y la recolección de los viriones producidos por dicha primera célula;

iv) la aplicación de una etapa de inmunoselección a los viriones producidos;

v) infectar al menos una segunda célula con tales viriones recolectados;

vi) proporcionarle a dicha segunda célula las funciones celulares, virales, físicas y / o químicas auxiliares necesarias para el empaquetamiento de un virión;

40 vii) incubar dicha segunda célula bajo condiciones adecuadas para el empaquetamiento de viriones y la recolección de los viriones producidos por dicha primera o segunda célula;

mientras que las etapas iv) a vii) pueden ser repetidas varias veces.

Las funciones no estructurales como por ejemplo la proteína Rep se pueden proporcionar en cis o en trans.

Además, la primera y la segunda célula pueden ser de la misma clase o tipo.

5 Las etapas de inmunoselección son bien conocidas en la técnica. Se puede pensar en varios métodos para utilizar anticuerpos o moléculas similares, tales como fragmentos F<sub>AB</sub> o anticuerpos de cadena sencilla para inhibir el enlazamiento o captación de los viriones por la segunda célula. Por ejemplo se pueden incubarse previamente los viriones producidos con anticuerpos monoclonales o policlonales. Si los anticuerpos se enlazan a un sitio crítico del virión que está involucrado en el mecanismo de infección, esto se traducirá en una selección negativa para viriones reconocidos por tal anticuerpo. Se podrían utilizar cualquiera de los anticuerpos monoclonales conocidos o sueros de mamíferos inmunopositivos, especialmente de humanos. Los anticuerpos policlonales contenidos en estos sueros tendrían la ventaja, de que se podrían seleccionar negativamente los viriones que escapan a los anticuerpos de neutralización sin tener aislado el anticuerpo. Una etapa de escogencia por inmunoselección adicional es una reacción de inmunoagotamiento usando cromatografía de afinidad con columnas de anticuerpos. Se puede utilizar material de columna tal como Sefarosa activada con CNBr para enlazar anticuerpos monoclonales o policlonales. Los viriones producidos pueden ser luego incubados con dicha columna de anticuerpos lo que conduce a un eluato de la columna donde los viriones de enlazamiento se han agotado.

15 La invención involucra además un polipéptido que comprende un péptido con la secuencia RGDVGV, RGDTPS, GKLFVDR, RDNVVP, GENQARS, RSNVVP, RSNVVP o NSVRAPP.

Preferiblemente, el polipéptido en el contexto de la invención consiste en un péptido con la secuencia de RGDVGV, RGDTPS, GKLFVDR, RDNVVP, GENQARS, RSNVVP, RSNVVP o NSVRAPP.

20 De acuerdo con una forma de realización preferida adicional, el polipéptido de la invención es un polipéptido Cap, preferiblemente derivado de un parvovirus, especialmente de un AAV.

La invención describe además al uso de un polipéptido como se definió anteriormente o que comprende o que consiste de un péptido con la secuencia de RGDXXXX, RGDXPXX, o DDDXPXX con la excepción de AGTFALRGDNPQG, para la redireccionamiento de los virus eucariotas, preferiblemente parvovirus, especialmente AAV.

25 Además, todos los péptidos identificados se pueden utilizar para el direccionamiento de los vectores no virales. Otros usos potenciales de los péptidos están activando o bloqueando las rutas celulares, por ejemplo, mediante la activación o inhibición del receptor debido al enlazamiento de péptidos aislados al receptor respectivo. Los péptidos también se pueden utilizar como fusiones con otros péptidos o cualesquiera otras moléculas adecuadas de elección. Los péptidos en esta configuración se pueden utilizar para acoplar dicha fusión a la superficie de una célula con el fin de, por ejemplo, teñir, etiquetar, clasificar o matar la célula.

30 Los péptidos también se pueden utilizar para la purificación de las fusiones o viriones que los contienen mediante el acoplamiento del receptor respectivo sobre perlas y permitir el enlazamiento de tales fusiones / viriones a dichas perlas acopladas (cromatografía de afinidad). Por lo tanto, tales viriones seleccionados no sólo tienen la ventaja de la especificidad de células cambiadas, sino también que pueden ser purificadas por cromatografía de afinidad utilizando su receptor específico.

35 Los péptidos RGDVGV y RGDTPS así como RGDXXXX, RGDXPXX y DDDXPXX son útiles en combinación con células que expresan integrinas de enlazamiento RGD. Las integrinas de enlazamiento RGD son receptores que se expresan ampliamente entre las células eucariotas (Ruoslahti E (1996) Annual Review of Cell and Developmental Biology 12, 697 - 715; Aumailley M et al. (1990): FEBS Lett 12: 262 (1): 82 - 6). Un ejemplo de una integrina que se enlaza con motivos RGD son las integrinas  $\alpha_v\beta_5$  y  $\alpha_v\beta_1$ . Tales células son por ejemplo los megacariocitos, por ejemplo, la línea celular utilizada para el cribado de M-07e.

40 Los péptidos GKLFVDR, RDNVVP, GENQARS, RSNVVP, RSNVVP o NSVRAPP son útiles para las células B-CLL y las células Mec1. Estos péptidos se enlazan a uno o más receptores celulares que no han sido identificados hasta ahora. Cada célula o línea celular que expresa uno o más de estos receptores es un objetivo potencial para estos péptidos. Se sabe en la técnica cómo poner a prueba una línea celular o célula, si uno de los péptidos es capaz de enlazarse a la superficie de la célula. Ya que estos péptidos fueron identificados mediante el cribado de la biblioteca contra las células hematopoyéticas, es razonable predecir que muchas otras células hematopoyéticas enlazarán aquellos péptidos, por ejemplo células B.

45 La invención divulga además un virión recombinante que puede ser obtenido por los métodos de la invención para la selección de un virión recombinante.

Además, la invención divulga un gen cap mutante que puede ser obtenido por los métodos de la invención para la identificación de un gen cap mutante.

Además, la invención se refiere a una proteína Cap codificada por el gen cap mutante en el contexto de la invención.

Además, la invención se refiere a un virión que comprende la proteína Cap en el contexto de la invención.

5 Además, la invención se refiere a un medicamento para el tratamiento de un paciente que sufre de cáncer, una enfermedad autoinmune, una enfermedad infecciosa o un defecto genético que comprende un virión, un gen cap o una proteína Cap en el contexto de la invención.

Además, la invención se refiere a un método para tratar un paciente que sufre de cáncer, una enfermedad autoinmune, una enfermedad infecciosa o un defecto genético que comprende administrar al paciente un virión, un gen cap, o una proteína Cap en el contexto de la invención.

Los siguientes ejemplos y figuras pretenden explicar la invención en forma detallada sin limitarla.

10 Breve descripción de las Figuras y las Tablas

Fig. 1. Mapa esquemático del plásmido pwt99oen.

15 Fig. 2. Construcción de la biblioteca de partículas modificadas de la cápside de AAV-2. Se clonó una fuente de oligonucleótidos generados en un genoma de AAV-2 que codifica un plásmido en el sitio correspondiente al sitio del aminoácido 587 de la proteína de la cápside VP1. La fuente obtenida de plásmidos se transfectó en células 293. Siguiendo un protocolo estándar de producción de virus, se generó una biblioteca de aproximadamente  $10^8$  clones de AAV-2 modificados de la cápside.

20 Fig. 3. Procedimiento de criba para despliegue de AAV para la selección de mutantes redireccionados. Se infectaron las células objetivo con la biblioteca de clones AAV-2 modificados de la cápside y con adenovirus (auxiliar para la replicación de AAV). Se removieron los viriones no infecciosos mediante etapas de lavado 2 h después de la infección. La progenie viral recolectada 48 h después de la infección se utilizó para la siguiente ronda de selección. La evolución de la población de AAV después de cada ronda se controló mediante la determinación del título y la secuenciación.

25 Fig. 4. Ejemplo de la evolución de la población viral durante 6 rondas de selección en células M07e. (A) cuantificación del ensayo de transferencia puntual (*dot blot*) de la progenie viral cosechada después de cada ciclo de infección. (B) La secuenciación de la inserción aleatoria que contiene la región del gen cap muestra la pérdida progresiva de la heterogeneidad en la población viral recolectada después de cada ronda de selección. Después de 5 rondas se podía detectar un solo clon (en el ejemplo mostrado que porta una secuencia RGDVGV insertada) en la progenie viral.

30 Fig. 5. Eficiencias de transducción. Las eficacias de transducción  $\pm$  la desviación estándar tal como se determina mediante análisis FACS en experimentos por duplicado para los mutantes de rAAV-GFP seleccionados (barras negras). Se evaluaron también las tasas de transducción después de la incubación previa de la preparación viral con heparina soluble (barras blancas) o la incubación previa de las células con GRGDTP de competencia (barras grises) y péptidos GRGES inactivos (barras de franjas diagonales).

a) Células M-07e.

35 b) Dependencia de la concentración de la inhibición mediada por RGDTP de la transducción de células M-07e por rAAV/M07A (círculos blancos) y de rAAV-M07T (círculos negros).

c) Células CO-115.

d) Células HeLa.

e) Células Mec1.

40 f) Células B-CLL primarias obtenidos de cuatro pacientes diferentes.

45 Fig. 6. Un ensayo de neutralización en células HeLa. (A) títulos de anticuerpos de neutralización contra de rAAV y rAAV-587/L14. Se analizaron las diluciones seriales (1:10 - 1:1200) de 15 muestras de suero humano de neutralización (P3 - P65) en células HeLa. Como control, se ensayó suero de conejo dirigido contra el ligando de L14 insertado ( $\alpha$ -L14). Los títulos de neutralización ( $N_{50}$ ) se expresan como la dilución a la que la transducción se redujo en un 50% en comparación con el control positivo. rAAV (B) y rAAV-587/L14 (C) se incubaron con suero P35 (1:80)



5 Se mantuvieron células HeLa (carcinoma epitelioide de cuello uterino humano, ATCC CCL 2), células M-07e, una línea celular de leucemia megacariocítica humana (obtenida a través de James D. Griffin, Boston, Massachusetts), Mec1, una línea celular derivada de un paciente con B-CLL en la transformación prolinfocitoide (obtenida a través de Federico Caligaris-Cappio, Torino, Italia), células CO-115 (carcinoma de colon humano) y células 293 (riñón embrionario humano) en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) (HeLa y 293), medio DMEM/NUT.Mix.F-12 (CO-115), medio RPMI (M-07e) o medio de Isocove (Mec1) suplementado con 10% de suero de ternera fetal (FCS), penicilina (100 U / ml) y estreptomycin (100 µg / ml), y L-glutamina (2 mM), a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Para las células M-07e, se añadieron 10 ng / ml de interleuquina 3 (IL-3) al medio.

10 La sangre periférica se obtuvo con el consentimiento informado de cuatro pacientes con un diagnóstico establecido de B-CLL. Las células mononucleares se aislaron en un gradiente de densidad de Ficoll/Hypaque (Seromed, Berlín, Alemania) por centrifugación, reducido en monocitos mediante adherencia a frascos plásticos de cultivo de tejidos y se cultivó en medio de Isocove suplementado como para las células Mec1. Más del 98% de las células aisladas coexpresaron CD5 y CD19 de acuerdo a la evaluación hecha por citometría de flujo, por lo tanto, las células B no malignas no constituían una fracción significativa del total de células aisladas. Los pacientes fueron o bien no tratados o no habían recibido tratamiento citorreductor por un período de al menos un mes antes de la investigación y estaban clínicamente estables y libres de complicaciones infecciosas.

#### Determinación de las eficiencias de transducción

20 Se sembraron células en placas de 24 o de 96 pozos (Nunc, Wiesbaden, Alemania) y se infectaron con los clones de rAAV-GFP, se recolectaron 48 horas después de la infección, se lavaron y resuspendieron en 1 ml de PBS. El porcentaje de células que expresan GFP se determinó mediante citometría de flujo con un Coulter Epics XL-MCL (Beckman Coulter, Krefeld, Alemania). Se analizaron un mínimo de 5.000 células para cada muestra. La infectividad de los mutantes redireccionados se determinó en presencia o en ausencia de diversas concentraciones de péptidos GRGDTP o GRGES (Bachem, Bubendorf, Suiza) o 5 .IU. / µl de heparina soluble (Braun, Melsungen, Alemania).

#### Selección de mutantes redireccionados de AAV-2

25 Se súper infectaron 10<sup>7</sup> células objetivo con 1.000 partículas/célula de biblioteca genómica y con adenovirus en una MOI de 20 y se incubaron a 37 °C. Dos horas después de la infección se centrifugaron, se resuspendieron en medio de cultivo fresco e incubaron a 37 °C las células. Cuarenta y ocho horas después de la infección, se enjuagaron las células con 5 ml de PBS, se resuspendieron en 5 ml de amortiguador de lisis (NaCl 150 mM, Tris / HCl 50 mM, pH 8,5) y se lisaron mediante 3 ciclos de congelación / descongelación. Se removieron los residuos celulares por centrifugación y se usó el sobrenadante para infectar el siguiente lote de células objetivo (segunda ronda de infección). Después de cada ronda de selección se purificó el ADN viral a partir de una alícuota de 100 µl de los lisados crudos mediante extracción con fenol / cloroformo y se secuenció la región 587 (cebador 4066-back).

#### **Ejemplo 2:** Selección de mutantes redireccionados de AAV-2 para las células M-07e y Mec1

35 Se generó una biblioteca de 4 x 10<sup>6</sup> partículas virales de cápside modificadas que portaban inserciones aleatorias de 7 aminoácidos en la posición 587 (Fig. 2 y Ejemplo 1). La fuente de mutantes de la cápside se sometió a ciclos repetidos de infección y recolección de la progenie viral de las células diana (Fig. 3). Los viriones con capacidad deteriorada para entrar en las células fueron removidos cambiando el medio de cultivo 2 h después de la infección (pi). Se extrajo la progenie viral de las células 48 horas pi mediante ciclos de congelación / descongelación y se utilizaron para infectar un nuevo lote de células objetivo en una nueva ronda de selección. Después de cada recolección, se usó una pequeña alícuota (100/tl) del lisado sin purificar para extraer ADN viral. Mediante la titulación de este ADN y secuenciación de la región 587 fue posible controlar la evolución de la biblioteca (Fig. 4). La presión selectiva proporcionada por el ambiente de cultivo condujo la selección por medio de su capacidad para llevar a cabo cada paso en el proceso de infección, es decir, enlazamiento, captación, eliminación del revestimiento, translocación nuclear, replicación y expresión génica.

45 El potencial del sistema de despliegue de AAV para la generación de mutantes redireccionados fue probado en dos líneas celulares que son resistentes a la infección por wt AAV-2.

50 M-07e es una línea celular megacariocítica humana (Avanzi GC et al. (1988) Br.. J. Haematol. 69, 359 - 66). El fracaso de AAV-2 para infectar estas células ha justificado el uso de esta línea celular como control negativo en varios experimentos de infección reportados por AAV-2. Bartlett J. S. et al. (1999) Nat. Biotechnol. 17, 181 - 186; Ponnazhagan S et al. (1996) J. Gen. Virol. 77, 1111 - 1122).

Mec1 es una línea celular derivada de células de leucemia linfocítica crónica de células B (B-CLL) en la transformación prolinfocitoide (leucemia Stacchini A et al. (1999) Leuk. Res. 23, 127 - 36) y también es resistente a la infección por wt AAV-2.

Una selección típica se representa en la Fig. 4. La cantidad detectada de ADN viral en los lisados sin purificar y el análisis de la secuencia mostraron que el número de viriones recuperados aumentó después de cada ronda, mientras que la heterogeneidad de la fuente se perdió progresivamente. Después de 5 rondas sólo un único clon estaba presente en la progenie viral. La aplicación de la biblioteca a células M-07e condujo a la selección de un clon que porta una secuencia RGDAVGV en el sitio 587 (Fig. 4). En un experimento paralelo se aisló un clon que portaba una secuencia RGDTPTS. En forma muy interesante, ambos clones aislados a partir de células M-07e condujeron a la selección de un motivo RGD, que se sabe que se une a varios tipos de integrinas celulares (Ruoslahti E (1996) Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 12, 697 - 715). Experimentos análogos llevados a cabo con células Mec1 condujeron a la identificación de clones que portan péptidos GENQARS, GKLFVDR, NSVRAPP y RSNAVVP/RSNGVVP, respectivamente (datos no mostrados).

### Ejemplo 3: Clonación de mutantes seleccionados

Las secuencias de ADN seleccionadas fueron clonadas en plásmidos adecuados para la producción de vectores de AAV recombinantes (rAAV) de cápside modificada que codifican la proteína fluorescente verde (GFP) mejorada. Se produjeron los correspondientes vectores redireccionados que expresan GFP rAAV-M07A (inserción de RGDAVGV), rAAV-M07T (inserción de RGDTPTS), rAAV-MecA (inserción de GENQARS) y rAAV-MecB (inserción de RSNAVVP) (véase el Ejemplo 1) y se determinaron los títulos genómicos mediante un ensayo de transferencia puntual. Los títulos genómicos de los mutantes seleccionados fueron comparables o más altos que los títulos de vectores de AAV con cápside no modificada (rAAV-wt) (Tabla 1).

### Ejemplo 4: Eficiencia de transducción de vectores redireccionados

Los mutantes de la cápside seleccionados fueron analizados por su capacidad de transducir células M-07e (Fig. 5a). Con una relación de partículas genómicas/célula de  $2 \times 10^4$ , los mutantes rAAV-M07A y de rAAV-M07T efectuaron la transducción de  $50 \pm 2,5\%$  y  $47 \pm 2,7\%$  de las células M-07e, respectivamente, que representa un aumento de 100 y 94 veces en comparación con la eficacia de transducción de rAAV-wt ( $0,5 \pm 0,01\%$ ). En contraste, rAAV-MecA y rAAV-MecB efectuaron la transducción de células M-07e con una eficiencia de sólo  $8,1 \pm 1,5\%$  y  $16 \pm 2\%$ . Se comparó también el vector rAAV-L14, que porta un motivo RGD insertado en la posición 587 (Girod A et al. (1999), ver más arriba). En forma muy interesante, rAAV-L14 efectuó la transducción sólo de  $10 \pm 0,7\%$  de las células M-07e, que era cinco veces menos eficiente que los mutantes seleccionados rAAV-M07A y de rAAV-M07T. Esto pone de relieve la ventaja del enfoque de combinación en comparación con la simple inserción de una secuencia exógena.

### Ejemplo 5: Tropismo de los vectores redireccionados

A continuación se examinó si la transducción de las células M-07e por los vectores rAAV-M07A y rAAV-M07T fue mediada específicamente por los aminoácidos insertados en la posición 587. En la cápside de wt AAV, la región alrededor de la posición 587 está implicada en el enlazamiento proteoglicano de heparán sulfato (HSPG) (Nicklin S. A. et al. (2001) Mol. Ther. 4, 174 - 81; Wu P. et al. (2000) J. Virol. 74, 8635 - 47), el receptor primario de AAV-2 (Summerford C y Samulski J (1998) J. Virol. 72, 1438 - 45). La incubación previa con heparina soluble, un análogo y competidor de HSPG, inhibió la transducción de células M-07e por rAAV-MecB pero no por rAAV-M07A, rAAV-M07T y rAAV-MecA (Fig. 5a). Esto indicó que la inserción de aminoácidos heterólogos apropiados en este sitio abolió el requisito de AAV para utilizar HSPG como un receptor primario para la entrada transmembrana. En marcado contraste, la incubación previa de las células M-07e con un péptido GRGDTP soluble competidor ( $450 \mu\text{M}$ ) inhibió casi completamente la transducción de las células M-07e por rAAV-M07A y rAAV-M07T (Fig. 5a). Este efecto era dependiente de la concentración (Fig. 5b). La incubación previa con un péptido inactivo (GRGES) ( $450 \mu\text{M}$ ) no tuvo ningún efecto (Fig. 5a). Tomados en conjunto, los resultados demuestran que rAAV-M07A y rAAV-M07T transducen células objetivo a través de la interacción específica del motivo RGD seleccionado presentados en la cápside viral con un receptor de integrina expresado en la superficie de las células objetivo.

También se examinaron los mutantes seleccionados en las células que expresaban HSPG y eran permisivas para la infección de wt AAV-2. En las células CO-115 de carcinoma de colon humano (Carrel S et al. (1976) Cancer Res. 36, 3978 - 84) la eficiencia de la transducción de los mutantes del virus rAAV-M07A, rAAV-M07T, rAAV-MecA y rAAV-MecB se redujo en un 50, 43, 12 y 31%, respectivamente, en comparación con wt AAV-2 (Fig. 5c), mientras que era similar al de wt AAV-2 en células HeLa (Fig. 5d). En ambas líneas celulares, se bloqueó la transducción por los mutantes rAAV-M07A y rAAV-M07T casi completamente por el péptido GRGDTP, pero no por el péptido GRGES ni por heparina. En contraste, la transducción por rAAV-wt y rAAV-MecB fue inhibida por heparina, pero no por el péptido GRGDTP (Fig. 5c y d). Además, las células que carecían de la expresión de un receptor de integrina no eran permisivas para la transducción por los mutantes rAAV-M07A y rAAV-M07T (datos no mostrados). Tomados en conjunto, estos resultados demuestran que el receptor de integrina que reconoce el péptido RGD en cápsides de rAAV-M07A y de rAAV-M07T también se expresa en células CO-115 y HeLa. Por lo tanto, el tropismo de los mutantes de cápside seleccionados no está restringido a las líneas celulares hematopoyéticas, sino a un receptor de integrina, que es probablemente ampliamente expresado.

El redireccionamiento exitoso de mutantes seleccionados en células Mec1 se representa en la Fig. 5e. Mientras que la transducción de células Mec1 por rAAV-wt no era detectable, los mutantes rAAV-MecA y rAAV-MecB efectuaron la transducción hasta de un 23% de estas células en una proporción partículas genómicas / célula de  $4 \times 10^4$ . Usando rAAV-MecA, se examinó luego la eficiencia de la transducción en células leucémicas primarias con el fin de explorar la relevancia clínica potencial de la tecnología de despliegue de AAV. Las células B-CLL primarias son resistentes a la transducción por la mayoría de los sistemas de vectores vitales disponibles en la actualidad, incluyendo AAV (Cantwell M. J. et al. (1996) Blood 88, 4676 - 83; Rohr U. P. et al. (1999) Blood 94, 181a). En notable contraste con vectores con cápside sin modificar, rAAV-MecA ( $8 \times 10^4$  partículas genómicas / célula) efectuaron la transducción de células leucémicas primarias aisladas de cuatro pacientes con B-CLL con una eficiencia del 54, 49, 23 y 21%, respectivamente (Fig. 5f ). En contraste, rAAV-M07A y rAAV-M07T fallaron en transducir células B-CLL primarias (datos no mostrados). Los resultados indican que tales vectores modificados podrían ser útiles para una terapia génica basada en AAV de B-CLL. Cantwell M. et al. (1997) Nature Med. 3, 984 - 89; Wierda W. G. et al. (2000) Blood 96, 2917 - 24).

Cualquier intento exitoso de modificar virus por ingeniería genética para terapia génica somática humana dependerá de nuestra capacidad para generar vectores de redireccionamiento que retienen las principales funciones necesarias para un procesamiento intracelular apropiado. Nuestros hallazgos parecen muy pertinentes en este sentido. Debido a la complejidad de la interacción virus-célula, es altamente ventajoso cribar mutantes de virus adecuados de una gran biblioteca en lugar de generar un número limitado de variantes de virus por una conjetura más o menos educada. Dado que no se emprendió ningún refinamiento del proceso de selección, se mantuvieron algunas limitaciones: los mutantes de la cápside mostraron especificidad por el receptor, pero no especificidad por la célula. Sin embargo, la meta de producir clones virales con una restricción adicional del tropismo del virus se debe lograr mediante la adición de etapas al proceso de cribado que agotan aquellos clones capaces de infectar tipos de células no deseadas. Una mejora adicional de esta tecnología puede ser la generación de una biblioteca de AAV con inserciones aleatorias en múltiples sitios de la cápside. Además, el virus desplegado podría también ser utilizado para la identificación de variantes de la cápside que son menos eficientemente reconocidas por anticuerpos humanos o células efectoras inmunes. Finalmente, la falta de las inserciones que se utilizaron exitosamente para generar clones de redireccionamiento sugiere que esta tecnología puede ser aplicable en otros sistemas virales.

### Ejemplo 6

En dos experimentos completamente independientes, después de 5 rondas de selección en células M07e (resistentes a la infección por wt AAV-2) las secuencias obtenidas no mostraron características aleatorias en el sitio de la inserción y fueron capaces de caracterizar dos motivos RGD altamente homólogos que contienen las secuencias: RGDVGV y RGDTPTS.

Los oligonucleótidos que codifican para estas secuencias peptídicas se clonaron en plásmidos GFP-AAV. Los mutantes correspondientes se empaquetaron y utilizaron para infectar células M07e. Para ambos mutantes, la infección de células M07e con 2.000 partículas genómicas / célula resultó en tasas de transducción superiores al 86% (la tasa de transducción de wt AAV-2 fue menor al 6%).

Las rondas de selección realizadas en una línea celular (Mec1) derivada de células de B-CLL en la transformación prolinfoide, condujeron a la identificación de varias secuencias que proporcionaron cápsides de AAV con mejor eficiencia de infección en estos tipos de células. En particular, la secuencia GENQARS confirió a viriones GFP-AAV tasas de transducción de hasta 20% en células Mec1, y hasta del 55% en células B-CLL primarias (ambos tipos de células son no permisivas a la infección con wt AAV).

Producción de la biblioteca de AAV.

La estrategia de clonación se ilustra en la Fig. 2. Se generó una biblioteca combinatoria de AAV para la selección de clones redireccionados por clonación de oligonucleótidos generados de forma aleatoria con una longitud de 21 bases en el sitio genómico correspondiente a posición del aa 587 usando el plásmido pWT99oen (Fig. 1, secuencia dada).

La secuencia insertada constaba de 7 repeticiones de codones NNB (N = A, C, G o T; B = C, G o T) para permitir una reducción del 50% de la probabilidad de codones de detención.

Si bien los aminoácidos de tipo silvestre que flanquean la posición 587 fueron todos retenidos, se modificó por ingeniería genética una secuencia doble y triple de Ala secuencia arriba y secuencia abajo de la secuencia aleatoria, respectivamente, con el fin de aumentar la flexibilidad del péptido insertado y para reducir el estrés conformacional de la estructura de la cápside nativa.

Se obtuvieron aproximadamente  $5 \times 10^7$  plásmidos que contienen las inserciones generadas aleatoriamente. Más de 20 de estos plásmidos se secuenciaron para controlar el resultado de la clonación; todos los plásmidos

secuenciados contenían una inserción aleatoria de 21 bases en la posición correcta.

Este flujo de plásmidos se transfectó en células de empaquetamiento 293 de forma concomitante con un plásmido auxiliar que contiene los genes de adenovirus, necesarios para el empaquetamiento de los viriones de AAV.

5 Se recolectó la progenie viral mediante un protocolo de purificación estándar en un gradiente discontinuo de iodixanol (Samulski et al.).

Se midieron los títulos genómico e infeccioso de la preparación viral mediante transferencia puntual y análisis de inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo anti rep y se cuantificaron en  $4 \times 10^{11}$  viriones / ml y  $6 \times 10^8$ /ml, respectivamente.

10 La secuencia obtenida después de la digestión de las proteínas virales con proteinasa K y extracción con fenol / cloroformo se representa en la Fig. 4 y confirma la naturaleza aleatoria de la inserción en el sitio 587.

Selección de los mutantes que infectan eficientemente las células objetivo.

15 Para demostrar la factibilidad del enfoque de selección combinatoria, se llevaron a cabo varias rondas de infección y recolección de la biblioteca de AAV en células Mo7e y Mec1 (siendo ambas líneas celulares casi completamente resistentes a la infección por AAV de tipo silvestre) con el fin de aislar los clones con mejor capacidad de infección. Esto se logró simplemente mediante la realización de ciclos repetidos de infección / recolección en las células objetivo. Una representación esquemática del procedimiento se representa en la Fig. 3. Se utilizó adenovirus con una MOI de 100 como auxiliar para la replicación de AAV.

20 En este sistema, el entorno del cultivo ejerce una fuerte presión selectiva en forma contemporánea sobre el enlazamiento, la entrada, la replicación y la capacidad de empaquetamiento de los clones virales. La replicación viral en sí misma ejerce en las células infectadas la etapa de amplificación necesaria para aumentar el número de mutantes viables que serán recolectados y utilizados para las rondas de selección posteriores.

25 Dos horas pi, se cambió el medio de cultivo para remover mutantes no infecciosos. Cuarenta y ocho horas pi se centrifugaron las células, se enjuagaron con PBS, se resuspendieron en 5 ml de amortiguador de lisis y se sometieron a 3 ciclos de congelación / descongelación para permitir la difusión de los viriones de la progenie en la solución. Los restos celulares se separaron por centrifugación a 5000 g.

Después de cada ronda de infección / recolección, se usó una pequeña alícuota de la preparación lisada sin procesar para medir el título genómico de la preparación y para la secuenciación de la respectiva población viral. La preparación restante se utilizó para infectar el siguiente lote de células objetivo.

Identificación y caracterización de mutantes redireccionados a las células M07e

30 La línea de células M07e es resistente a la infección por wt AAV-2. Esta característica ha sido atribuida a la falta de expresión del receptor primario putativo para AAV-2 (proteoglicano de heparán sulfato), y ha justificado el uso de esta línea celular como control negativo en muchos experimentos reportados de infección por AAV-2.

La Fig. 4 muestra los resultados de 5 rondas de infección / recolección de la fuente de AAV en estas células objetivo.

35 Ronda tras ronda, se pudo observar un ligero aumento del título genómico de AAV en la preparación de lisados sin purificar (como se evaluó mediante análisis de transferencia puntual). Al mismo tiempo, los picos de la carta de reacción de la secuencia en la porción de inserción al azar se hicieron cada vez más grandes durante el procedimiento de selección, y en el quinto ciclo fue posible leer una secuencia fija de la reacción de secuenciación.

40 El procedimiento de selección se llevó a cabo en dos experimentos independientes y dio como resultado la identificación de dos secuencias de ADN que codifican para los respectivos péptidos RGDVAVG y RGDTPTS. La Fig. 4 representa sólo el experimento que generó la secuencia RGDVAVG.

45 Las secuencias seleccionadas de ADN fueron clonadas en plásmidos adecuados para la producción de vectores de AAV recombinantes de cápside modificada que codifican para la proteína fluorescente verde mejorada (rAAV-GFP). Las versiones que expresan GFP de estos clones redireccionados (rAAV-M07A que contiene la secuencia de RGDVAVG y rAAV-M07T que contiene la secuencia de RGDTPTS) fueron producidas por protocolos estándar de producción de rAAV.

La capacidad de los mutantes rAAV-M07A y rAAV-M07T para transducir células M07e se comparó con las eficiencias de vectores con cápside no modificada (rAAV-wt) y de vectores que expresan la secuencia de L14 en el

sitio 587 (rAAV-L14). Se infectaron células M07e con relaciones de partículas genómicas / célula idénticas (Fig. 5). Las tasas de transducción fueron superiores al 88% cuando se utilizan los mutantes redireccionados, 6% utilizando mutantes de la cápside no modificados y 18% usando rAAV-L14.

5 De manera similar a los mutantes seleccionados, rAAV-L14 porta un motivo RGD que contiene la secuencia (del fragmento de laminina PI) insertado en el sitio 587. La eficiencia más de 5 veces superior de los mutantes generados por nuestro sistema de despliegue en comparación con rAAV-L14 pone claramente de manifiesto las ventajas del enfoque de despliegue combinatorio donde se seleccionan las modificaciones por su eficiencia directamente en la competencia del vector, en comparación con la inserción simple de una secuencia de redireccionamiento previamente conocida.

10 Para demostrar la especificidad y la naturaleza mediada por el receptor del proceso de infección, se midieron las tasas de transducción de células M07e de los clones virales en la presencia de un péptido RGDS competidor o un péptido RGS inactivo. La incubación de células objetivo con péptidos RGDS 100 µM antes de la infección redujo las eficiencias de transducción en del 50%. La incubación previa de las células con el péptido RGS no pudo inhibir la infección (Fig. 5 A).

15 Identificación y caracterización de mutantes redireccionados de células B-CLL.

Mec1 es una línea celular derivada de células de leucemia linfocítica crónica de células B en transformación prolinfoide (Stacchini et al.) y es resistente a la infección por wt AAV-2.

Después de 3 rondas de selección en células Mec1, fue posible leer una secuencia nucleotídica GANGANNACNNNNCNANNANN insertada en el sitio 587.

20 En otras configuraciones del procedimiento de selección en este tipo de células, después de 5 rondas podríamos aislar clones virales con inserciones que codifican para péptidos GKLFVDR, GENQARS, RSNGVVP o NSVRAPP.

25 La secuencia GENQARS se clonó en un plásmido apropiado para la producción de vectores de AAV recombinantes de cápside modificada que codifican para la proteína fluorescente verde mejorada (rAAV-GFP). Las partículas virales que expresan GFP de este clon redireccionado (rAAV-Mec1) fueron producidas mediante protocolos estándar de producción de rAAV.

La infección de células Mec1 con rAAV-Mec1 (20.000 partículas genómicas / célula) dio como resultado una tasa de transducción de aproximadamente 20%, mientras que rAAV-wt fracasó en transducir más de 2% de estas células (Fig. 5 B).

30 Las células B-CLL primarias son resistentes a la transducción con la mayoría de los sistemas de vectores virales actualmente disponibles y los informes anteriores fracasaron en mostrar para vectores AAV tasas de transducción mayores al 3% (cita del artículo de David). rAAV-Mec1 mostró eficacias de transducción de 54, 49, 21 y 23% cuando se aplica a células primarias obtenidas de 4 pacientes con B-CLL (Fig. 5 C). Con estas tasas de transducción, ahora es posible un enfoque de terapia génica con base en AAV para la cura de leucemia linfocítica crónica de células B, por primera vez. Además, se sugieren por estos resultados diferencias específicas del paciente en la permisividad de estas células primarias a los vectores de VAA y se confirman por otros datos obtenidos (documento presentado por Wendtner et al.). La tecnología de despliegue en virus abre el horizonte para la generación de vectores específicos del paciente. La optimización del protocolo para la selección de mutantes redireccionados directamente en células B-CLL primarias dará lugar a esta meta y se hacen actualmente esfuerzos en este sentido en nuestro laboratorio.

#### 40 Ejemplo 7

La transducción de células HeLa por rAAV-587/L14 no es inhibida por anticuerpos de neutralización preexistentes en muestras de suero humano

45 Una comprensión detallada de las principales dominios inmunogénicos en la cápside del virus adenoasociado (AAV) no es sólo importante con respecto al enlazamiento de anticuerpos del suero al virus y su posterior neutralización por el sistema inmune, sino también con respecto a la existencia de anticuerpos neutralizantes que inhiben directamente la infección de las células objetivo por los vectores de VAA. Para analizar la interferencia de diferentes antisueros humanos con la transducción de AAV, se utilizó un vector de AAV recombinante que codifica para GFP y que porta el ligando L14 en la posición 587 (rAAV-587/L14) para determinar si esta modificación bloquearía la capacidad de neutralización de antisueros humanos.

50 En primer lugar, se determinó la presencia de anticuerpos neutralizantes en muestras de suero humano. Se

analizaron 43 muestras de suero positivas para anticuerpos de AAV (Ab) en un ensayo de neutralización con un vector de AAV que codifica para GFP, que portaba la cápside de AAV de tipo silvestre (rAAV). Se incubó rAAV con diluciones seriadas de muestras de suero antes de la transducción de células HeLa. Después de eso, se evaluó el número de células que expresan GFP mediante análisis FACS. Se definieron los títulos de neutralización como la dilución de suero donde se redujo la transducción en un 50% ( $N_{50}$ ). Las muestras de suero se consideraron como neutralizantes cuando la  $N_{50}$  era 1:320 o superior. Treinta y una de estas 43 muestras de suero (72%) contenían Ab de neutralización contra AAV, de acuerdo con datos previamente publicados (Erles K et al. (1999) J. Virol 59: 406 - 11).

Quince de estas 31 muestras de suero fueron seleccionados al azar para su posterior análisis. Se determinó el efecto de estas muestras de suero en la transducción de células HeLa por rAAV-587/L14 en comparación con rAAV (Fig. 6A). Además, se analizaron el Ab monoclonal de neutralización C37-B (Wobus C. E. et al. (2000) J. Virol 74: 9281 - 93) y un suero anti-L14 (generado en contra del ligando L14). Para estos experimentos se utilizaron números idénticos de partículas de transducción de rAAV-587/L14 y rAAV. Ambos vectores se incubaron con diluciones en serie de muestras neutralizantes de suero antes de la transducción de células HeLa. Para todas las muestras de suero analizadas, la transducción por rAAV-587/L14 fue de 8 a 64 veces menor que la transducción por rAAV (15 veces en promedio). En 13 de 15 muestras de suero, la transducción de rAAV-587/L14 se vio sólo ligeramente afectada, con títulos de neutralización de 1:80 o menores, lo que demuestra la capacidad de rAAV-587/L14 para escapar de los efectos de Ab de neutralización (Fig. 6A). Sorprendentemente, rAAV-587/L14 fue capaz de escapar del Ab de neutralización en suero P47 a cualquier dilución analizada, y las muestras de suero P17, P31 y P37 redujeron la transducción sólo a una dilución de 1:20, donde no se podrían excluir las interacciones no específicas. Figuras 6B y 6C muestran un experimento representativo con suero P35, que inhibió completamente la transducción por rAAV a una dilución 1:80 (Fig. 6B). En marcado contraste, la transducción por rAAV-587/L14 no se vio afectada (Fig. 6C). Sólo dos muestras de suero (P16 y P48) fueron capaces de neutralizar eficientemente la transducción de rAAV-587/L14, con un  $N_{50}$  de 1:320. Suponemos que esto se debió al alto contenido de Ab de neutralización en estas muestras de suero, ya que la transducción por rAAV-587/L14 seguía siendo menos afectada que la transducción por rAAV. Como un control adicional, se analizó el Ab monoclonal C37-B. C37-B es un Ab de neutralización que inhibe el enlazamiento de AAV a la célula huésped (Wobus C. E. et al., ver más arriba). Si fracasa en enlazar rAAV-587/L14 en un ELISA (datos no mostrados), por lo tanto, no debe interferir con la transducción de rAAV-587/L14. Como era de esperar, la transducción de rAAV-587/L14 no fue neutralizada por C37-B, mientras que la transducción de rAAV podía ser totalmente inhibida por este anticuerpo (datos no mostrados). En marcado contraste, el suero anti-L14, que se generó contra el ligando L14, neutralizó completamente la transducción de rAAV-587/L14 en una dilución 1:160, mientras que la transducción de rAAV no se vio afectada (Fig. 6A). Para descartar la posibilidad de que estas observaciones fueran debidas a diferentes números de partículas físicas utilizadas para rAAV y rAAV-587/L14, hemos realizado experimentos de control adicionales, en los que se llevaron a cabo ensayos de neutralización con números idénticos de partículas físicas para ambos vectores AAV. Estos experimentos produjeron resultados idénticos (datos no presentados).

Tomados en conjunto, estos resultados demuestran que el rAAV-587/L14 mutante es capaz de escapar de Ab en muestras de suero humano.

Los sueros de neutralización no interfieren con el tropismo mediado por L14 de rAAV-587/L14 en células B16F10

La inserción del péptido L14 específico de integrina en 587 expande el tropismo de VAA a las células B16F10 no permisivas (Girod A et al. (1999) Nat Med 5: 1052 - 6). Para determinar si rAAV-587/L14 era capaz de mantener su capacidad de infectar la línea celular objetivo B16F10 a través del ligando insertado L14 en presencia de antisueros neutralizantes, se llevaron a cabo experimentos adicionales con muestras de suero seleccionadas. Se incubó rAAV-587/L14 con diluciones en serie de suero P35 antes de la transducción de células B16F10 irradiadas. Después de 72 horas se midió la expresión de GFP, rAAV-587/L14 efectuó la transducción en forma eficiente de células B16F10 a pesar de la incubación con P35 a una dilución 1:80, mientras que el suero anti-L14 inhibió completamente la transducción a esta dilución (Fig. 7B y 7C). Cuando se analizaron P37 y P26, se obtuvieron los mismos títulos de neutralización como los determinados sobre células HeLa (datos no mostrados). Estos hallazgos mostraron que el vector de direccionamiento de L14 de AAV podría escapar de anticuerpos neutralizantes en sueros humanos al tiempo que conserva su capacidad de redireccionamiento.

La capacidad de rAAV-587 para escapar a los sueros de neutralización no depende del ligando L14 insertado

Para excluir que el escape de antisueros neutralizantes fue causado por un ligando específico, se probó otro mutante de inserción, rAAV-587/MecA que porta un ligando de 7 aa (GENQARS) en la posición 587. Este mutante ha sido seleccionado por despliegue en AAV sobre células Mec1 y transduce eficientemente células Mec1 y células B primarias de pacientes con leucemia linfocítica crónica de una forma específica del receptor (como se describió anteriormente). Se incubaron rAAV-587/MecA y rAAV con el suero P35 antes de infectar células Mec1. La transducción de células Mec1 por rAAV-587/MecA no se vio afectada por el Ab de neutralización del suero P35 (dilución 1:80). En contraste, la transducción de rAAV fue casi completamente inhibida por este suero (Fig. 8).

Experimentos con otras muestras de suero neutralizante proporcionaron resultados idénticos (datos no presentados). Al igual que con las células HeLa, A20 fue capaz de inhibir la transducción de rAAV-587/MecA, mientras que C37-B no tuvo ningún efecto (datos no mostrados).

- 5 Tomados en conjunto, los resultados demuestran que la inserción de diferentes ligandos heterólogos en la posición 587 permite escapar de anticuerpos neutralizantes preexistentes. Las propiedades de direccionamiento de estos vectores se retienen en estos mutantes de la cápside, incluso en presencia de antisueros neutralizantes.

Discusión

- 10 Esta es la primera descripción de la generación y aplicación de una biblioteca combinatoria de virus eucariota para la identificación de vectores para el suministro de genes virales específicos del tipo de células. En los experimentos descritos, la aplicación de esta técnica dio como resultado la descripción de varios nuevos mutantes de AAV con alta eficiencia en la transducción de células que son resistentes a la infección por wt AAV.

- 15 Todos los mutantes descritos en el presente documento son específicos y muestran características de tropismo determinadas por la inserción en el sitio 587, como se ha demostrado por los experimentos de competición del péptido RGDS (Fig. 5A). Estos clones tampoco mostraron interacción con el receptor primario natural de AAV, proteoglicano de heparán sulfato (Tabla 1). Se podría lograr una especificidad adicional de los viriones mediante la introducción de otras modificaciones de la estructura de la cápside, por ejemplo, la combinación de la inserción de secuencias de redireccionamiento con modificaciones tales como la sustitución DEEEI-AAAA en 561-565 (Wu et al.), y/o la inserción de AISP en el sitio nucleotídico 3761 (Rabinowitz et al.).

- 20 Otra posibilidad para aumentar la especificidad de los vectores es la introducción de rondas de selección sustractivas, por ejemplo, la infección de células para las que no se desea la infección y la recuperación del sobrenadante que contiene viriones no infecciosos, o el uso de columnas de afinidad para agotar la población viral de los clones que se enlazan a la columna.

Una mejora adicional del sistema que está en marcha en nuestro laboratorio es la generación de una biblioteca de AAV con inserciones aleatorias a nivel de múltiples sitios de la proteína de la cápside.

- 25 La descripción del GENQARS mutante, que mostró tasas de transducción de hasta 55% de las células primarias B-CLL, tiene una relevancia inmediata para la terapia génica de esta neoplasia. Los intentos anteriores para transducir este tipo de células con vectores a base de AAV no pudieron alcanzar eficiencias superiores al 3%. Nuestros resultados también sugieren la importancia de establecer protocolos para la generación de vectores específicos para cada paciente. Con la tecnología de despliegue en AAV, esto es ahora posible.

- 30 La comparación de la eficiencia de la infección de los mutantes seleccionados al azar con el mutante L14, demuestra la importancia de la posición específica de la secuencia RGD, y de los aminoácidos que flanquean y por lo tanto sugiere las ventajas de la selección de las modificaciones de redireccionamiento directamente en el contexto estructural del vector.

- 35 La tecnología descrita en el presente documento para el virus adenoasociado puede ser adaptada para cualquier sistema viral.

Además de los objetivos de los sistemas de suministro de genes, el despliegue en AAV será una herramienta valiosa para la comprensión de la biología de este virus, para la caracterización de péptidos con interesantes propiedades biológicas, y para la investigación de interacciones específicas ligando-receptor.

Tabla 1

Clon viral	Título genómico / ml	Infectividad en HeLa	Infectividad en M07e	Infectividad en células B- CLL	Inhibición de heparina
wt	5 x 10 <sup>10</sup>	100%	1%	3%	+
L14	10 <sup>10</sup>	2%	20%	n.d.	-
rAAV-M07A	10 <sup>11</sup>	108%	100%	10%	-

40

ES 2 467 156 T3

(continuación)

Clon viral	Título genómico / ml	Infectividad en HeLa	Infectividad en M07e	Infectividad en células B- CLL	Inhibición de heparina
rAAV-M07T	$10^{11}$	91%	84%	29%	-
rAAV-Mec1	$5 \times 10^{10}$	100%	39%	100%	-

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para la producción de una biblioteca de ácidos nucleicos que comprende una multiplicidad mayor a  $10^5$  genes estructurales expresables de al menos un virus eucariota, que comprende las etapas de:
- 5 a) proporcionar un conjunto de ácidos nucleicos, donde cada uno codifica al menos un gen estructural de un virus eucariota y que comprende una secuencia adecuada de empaquetamiento, en donde el gen estructural contiene un inserto (2) que previene la formación de una proteína estructural funcional, y
- b) la inserción de un inserto (1) en el gen estructural para remover una secuencia del gen estructural, en donde la secuencia removida comprende o es parte del inserto (2) formando así genes estructurales potencialmente funcionales;
- 10 en donde los genes estructurales son genes cap de un virus no empaquetado, y en donde dicho virus no empaquetado es un parvovirus,
- 15 en donde el virus es AAV y en donde el inserto (1) se inserta después de un ácido nucleico correspondiente a cualquier sitio dentro de los primeros 1 a 50 aminoácidos del terminal amino, o correspondiente a las posiciones e loa aminoácidos 261, 381, 447, 534, 573 y/o 587 de la proteína de la cápside VP1, preferiblemente a la posición del aminoácido 447 o 587, en donde la numeración de los aminoácidos se refiere a la proteína VP1 de AAV2.
2. El método de la reivindicación 1, en el que la biblioteca de ácidos nucleicos comprende una multiplicidad mayor a  $10^6$  genes estructurales expresables.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que los genes cap son de AAV1 , AAV2 , AAV3 , AAV4 , AAV5 o AAV6.
4. El método de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el conjunto de ácidos nucleicos se deriva de un ácido nucleico.
- 20 5. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4, en el que el inserto (2) impide la formación de una proteína estructural funcional por que contiene un codón de detención.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que mediante la inserción del inserto (1) se elimina el codón de detención.
- 25 7. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 6, en el que el número de nucleótidos del inserto (1) y/o del inserto (2), preferentemente del inserto (1) y del inserto (2), es tres o un múltiplo de tres.
8. El método de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el virus es AAV y en el que el inserto (1) se inserta después de un ácido nucleico correspondiente a cualquier sitio dentro de los primeros 1 a 50 aminoácidos del terminal amino.
9. El método de la reivindicación 1 a 7, en el que el virus es AAV y en el que el inserto (1) se inserta después de un ácido nucleico que corresponde a las posiciones de los aminoácidos 261, 381, 447, 534, 573, y/o 587 de la proteína de la cápside VP1, preferiblemente a la posición del aminoácido 447 o 587.
- 30 10. El método de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el inserto (1) es generado al azar o parcialmente al azar.
11. El método de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el inserto (1) no contiene ningún codón de detención.
12. El método de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la biblioteca tiene una multiplicidad de mutantes virales que es mayor a  $10^5$ , especialmente mayor a  $10^6$ .
- 35 13. Una biblioteca de ácidos nucleicos que comprende una multiplicidad de genes estructurales expresables, en la que dichos genes estructurales son genes cap de un parvovirus, en donde el parvovirus es un AAV,
- en donde la multiplicidad de genes estructurales expresables es mayor a  $10^5$ , y en donde dicha biblioteca puede ser obtenida por el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12,
- 40 en donde las secuencias de ácido nucleico insertadas se insertan después de un ácido nucleico correspondiente a cualquier sitio dentro de los primeros 1 a 50 aminoácidos del terminal amino de VP1, o correspondiente a las posiciones de los aminoácidos 261, 381, 447, 534, 573, y / o 587 de VP1, preferiblemente a la posición del aminoácido 447 o 587, en donde la numeración de los aminoácidos se refiere a la proteína VP1 de AAV2.

14. La biblioteca de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la multiplicidad de los genes estructurales expresables es mayor a  $10^6$ .
15. La biblioteca de acuerdo con la reivindicación 13 o 14, en donde la biblioteca tiene una multiplicidad de mutantes virales que es mayor a  $10^6$ .
- 5 16. La biblioteca de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en la que el ácido nucleico es un ácido nucleico lineal, un plásmido, una partícula viral o un vector viral, por ejemplo, un vector de AAV recombinante.
- 10 17. La biblioteca de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, en la que el ácido nucleico comprende además secuencias de empaquetamiento tales como las ITR de AAV y por lo menos un gen expresable que proporciona las funciones necesarias para la replicación y el empaquetamiento de viriones tal como una proteína Rep de AAV.
18. La biblioteca de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17, en la que el ácido nucleico es ADN.
19. La biblioteca de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 18, en la que el gen cap se deriva de uno de los serotipos de AAV del grupo que comprende AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5 y AAV6.
- 15 20. La biblioteca de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 19, en la que una multiplicidad de secuencias de ácido nucleico se insertan en al menos un sitio del gen cap, en donde el número de nucleótidos insertados es de tres o un múltiplo de tres.
21. La biblioteca de acuerdo con la reivindicación 20, en la que las secuencias de ácido nucleico insertadas se generan de forma aleatoria, especialmente utilizando codones NNN, codones NNB o codones NNK.
- 20 22. La biblioteca de acuerdo con la reivindicación 20, en la que las secuencias de ácido nucleico insertadas se generan parcialmente al azar, especialmente mediante el uso de codones con uno, dos o tres nucleótidos fijos.
23. La biblioteca de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22, en la que las secuencias de ácido nucleico insertadas tienen una longitud de al menos 3 nucleótidos, preferiblemente de al menos 9, especialmente de al menos 18 nucleótidos.
- 25 24. La biblioteca de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 20 a 23, en la que las secuencias de ácido nucleico insertadas se insertaron utilizando endonucleasas estándar de restricción o sistemas de recombinación, preferentemente los sistemas de recombinación cre/lox o Gateway o técnicas de reacción en cadena de la polimerasa, preferiblemente utilizando cebadores degenerados.
- 30 25. La biblioteca de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 20 a 24, en la que las secuencias de ácido nucleico insertadas conducen a una inserción de aminoácidos en la proteína estructural VP1, VP2 y/o VP3, en un sitio que se encuentra en la superficie de la cápside.
26. La biblioteca de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 20 a 25, en la que las secuencias de ácido nucleico insertadas se insertan después de un ácido nucleico correspondiente a las posiciones de los aminoácidos 261, 381, 447, 534, 573, y / o 587 de VP1, preferiblemente en la posición del aminoácido 447 o 587.
- 35 27. La biblioteca de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 26, en la que el gen cap tiene al menos una mutación adicional que conduce por ejemplo a al menos una mutación puntual, al menos una supresión, inserción y/o sustitución interna de uno o varios aminoácidos o al menos una supresión, inserción y/o sustitución del terminal N o C de uno o varios aminoácidos ácidos, o una combinación de estas mutaciones, preferiblemente una mutación que inhibe el enlazamiento de proteoglicano de heparán sulfato, integrina y/o el enlazamiento del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR).
- 40 28. La biblioteca de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 27, en la que el gen cap tiene una inserción constante adicional de al menos un codón secuencia arriba y / o secuencia abajo del sitio de inserción de la secuencia de ácido nucleico insertada, preferiblemente de uno o dos o tres codones que codifican para Ala, Gly, Leu, Ile, Asp y/o Arg, especialmente una inserción de tres Ala secuencia arriba y dos Ala secuencia abajo del sitio de inserción.
- 45 29. Una biblioteca de viriones de AAV con modificaciones de la proteína de la cápside, en la que la biblioteca de viriones comprende la biblioteca de los ácidos nucleicos de las reivindicaciones 15 a 28.

Fig. 1

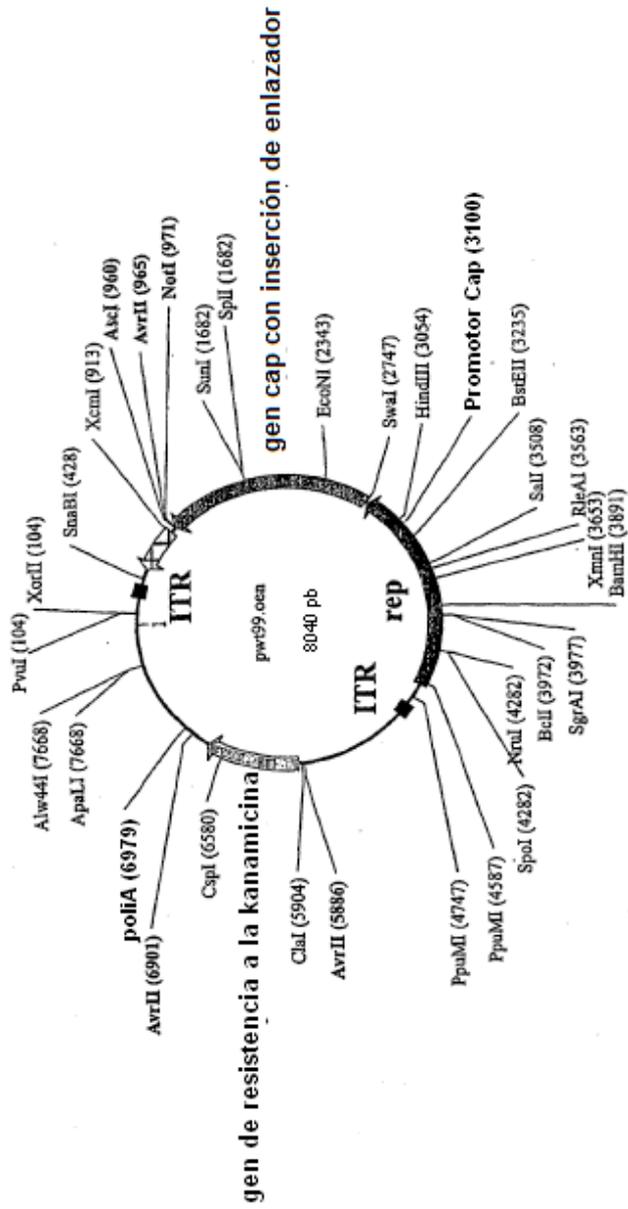


Fig. 2

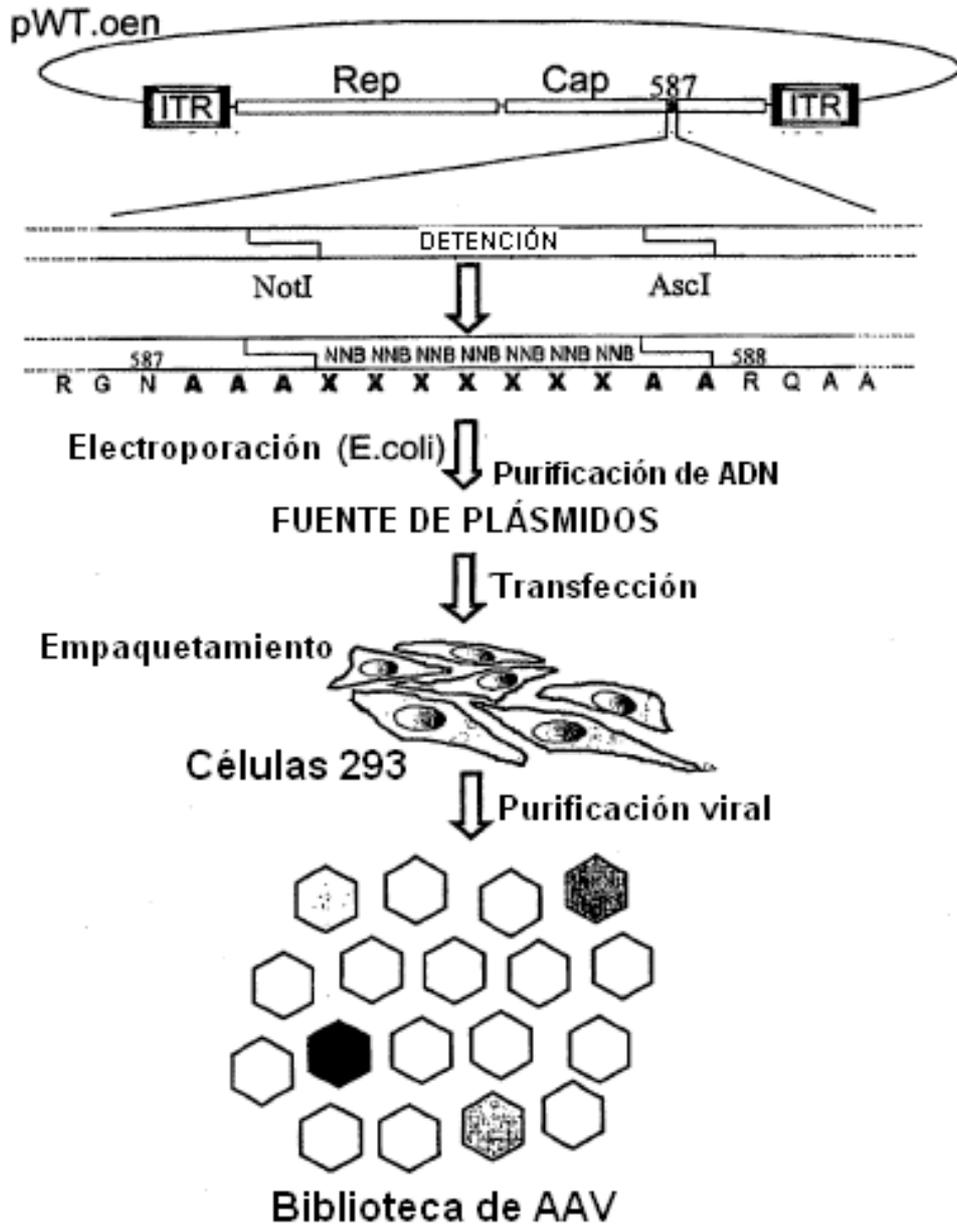
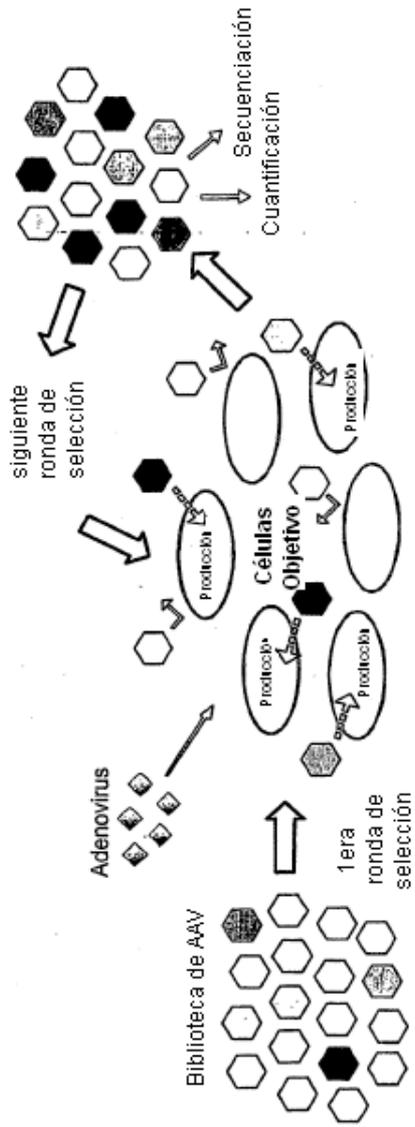
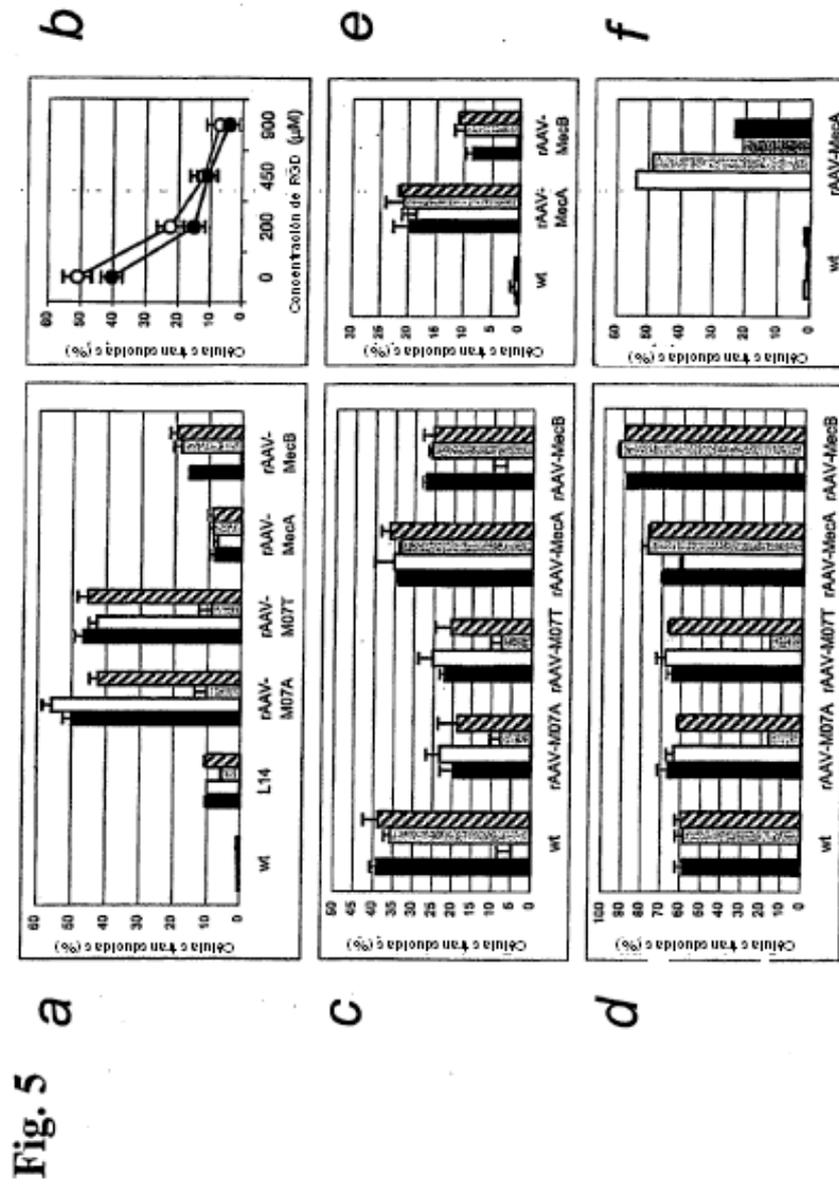


Fig. 3







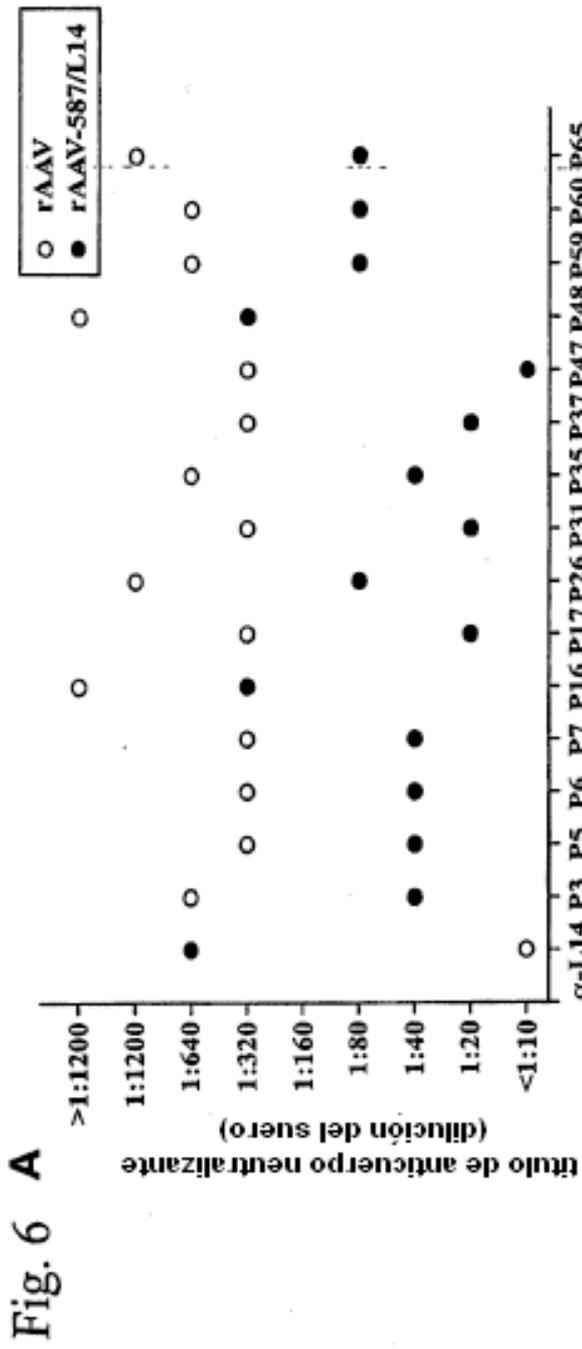


Fig. 7



