

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 564 553**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/005** (2006.01)

**C12N 7/00** (2006.01)

**C12N 15/86** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.08.2002 E 02786355 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.01.2016 EP 1427835**

54 Título: **Procedimiento para purificar vectores víricos que tienen proteínas que se unen a ácido siálico**

30 Prioridad:

**08.08.2001 US 310772 P**

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

**23.03.2016**

73 Titular/es:

**THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA (100.0%)  
3700 Market Street, Suite 300  
Philadelphia, PA 19104, US**

72 Inventor/es:

**WILSON, JAMES M.;  
AURICCHIO, ALBERTO y  
HILDINGER, MARKUS**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 564 553 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

Procedimiento para purificar vectores víricos que tienen proteínas que se unen a ácido siálico

- 5 El presente trabajo ha sido subvencionado, en parte, mediante la financiación de los National Institutes of Health, P30 DK47757. El Gobierno de EE. UU. puede tener determinados derechos en la presente invención.

### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 Los vectores de terapia génica basados en virus adenoasociado (AAV) serotipo 2 han demostrado ser preferentes para lograr una transducción estable tras la administración *in vivo*. Sin embargo, mientras que la estabilidad de la expresión transgénica era impresionante, su eficacia a menudo no lo era.

- 15 La investigación básica y el desarrollo comercial de vectores basados en el serotipo 2 se ha potenciado con el desarrollo de procedimientos cromatográficos para la purificación. Con el desarrollo de vectores AAV de otros serotipos ha surgido la necesidad de procedimientos de purificación de dichos vectores. Uno de dichos vectores, el AAV serotipo 5 (AAV5), ha demostrado ser un vector útil. Hasta la fecha, sin embargo, la purificación de vectores basados en AAV5 requería sedimentación con cloruro de cesio (CsCl<sub>2</sub>), puesto que no se une a la heparina que se ha usado para la purificación de AAV2. La sedimentación con CsCl<sub>2</sub> lleva mucho tiempo, no se puede realizar a escala y proporciona preparaciones muy contaminadas con proteínas celulares.

Kaludov *et al.* J. Virol. 6884 (2001) divulga que AAV4 y AAV5 requieren la unión a ácido siálico para la unión y transducción. El documento divulga la purificación de AAV mediante gradientes de cloruro de cesio convencionales.

- 25 Lo que se necesita son procedimientos de purificación para vectores basados en AAV5 que sean rápidos y se puedan aumentar a escala fácilmente para su uso en producción.

### SUMARIO DE LA INVENCION

- 30 La presente invención proporciona un procedimiento rápido para identificar y purificar de vectores víricos AAV4 y AAV5 de cultivos y otras soluciones que contienen materiales celulares y otros materiales víricos.

- 35 Por tanto, en un aspecto, la invención proporciona un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 10. El procedimiento de la invención es particularmente muy adecuado para aislar construcciones que contienen proteínas de la cápside de virus adenoasociados (AAV) serotipo 4 (AAV4) o AAV serotipo 5 (AAV5). El procedimiento implica poner en contacto la solución que contiene el AAV4 o AAV5 con ácido siálico que se ha enlazado a un soporte sólido. Por tanto, la construcción que tiene una proteína de la cápside que tiene un sitio de unión para ácido siálico se une de forma selectiva a la molécula enlazada a ácido siálico.

- 40 En un modo de realización preferente, el procedimiento de la invención implica dejar que una mezcla que contiene el AAV contacte con la mucina que se ha enlazado a un soporte sólido. Así, la AAV se une de forma selectiva al soporte enlazado a mucina. A continuación, el soporte sólido se lava para retirar material de la mezcla que está unida de forma inespecífica al soporte enlazado a mucina.

- 45 La invención se puede utilizar para proporcionar un kit útil para separar AAV4 o AAV5 que comprende una columna de cromatografía de líquidos o una solución que contiene un soporte sólido que tiene mucina enlazada al mismo.

- 50 En otro aspecto, la invención proporciona un kit útil para detectar la presencia de AAV4 o AAV5 en una muestra biológica, de acuerdo con la reivindicación 15. Dicho kit contiene un soporte sólido que tiene una molécula que comprende ácido siálico enlazado a la misma y un reactivo que permita la detección visual de la unión de dicho AAV4 o AAV5 a la molécula.

Todavía otras características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de la invención.

- 55 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

- 60 La presente invención proporciona un procedimiento para aislar y detectar virus que tienen proteínas de superficie que se unen de forma específica a ácido siálico (tales como AAV4 o AAV5) usando mucina fijada a un soporte sólido. La retirada de los virus unidos de forma específica por elución o incubación con una solución de alta salinidad recupera eficazmente virus altamente activos de pureza mayor que la que se logra mediante la sedimentación con CsCl<sub>2</sub>. Los virus aislados son altamente infecciosos y más puros que los aislados usando gradientes de CsCl<sub>2</sub> convencionales. Además, esta técnica es rápida, no requiere equipo especial y se puede aumentar a escala fácilmente. Estas son características importantes para la producción de virus de alta calidad que se van a usar en la investigación de transferencia. La invención proporciona además kits útiles para el aislamiento y detección de virus usando los procedimientos descritos en el presente documento, que utilizan una columna de afinidad de una sola

etapa para la purificación y detección de vectores víricos y, opcionalmente, un sistema marcador visualmente detectable.

Estos y otros aspectos de la invención se describen en más detalle en el presente documento.

## OBJETIVOS DE PURIFICACIÓN

El procedimiento de la invención es particularmente muy adecuado la separación y aislamiento de vectores víricos que tienen cápsides compuestas por proteínas de la cápside de AAV serotipo 5 o proteínas de la cápside de AAV serotipo 4. Los inventores han descubierto que estos serotipos de AAV se pueden separar fácilmente de los materiales encontrados en los cultivos en los que se producen estos virus por la capacidad de su cápsides para unirse de forma específica a ácido 2,3-sialílico. Por el contrario, los otros materiales (por ejemplo, proteínas celulares y otras proteínas víricas) encontrados en cultivos de producción libres de colaborador para AAV no se unen de forma específica a ácido sialílico. De forma similar, el procedimiento de la invención es útil para la separación y aislamiento de proteínas de la cápside de AAV4 o AAV5 a partir de cultivos de producción dependientes de colaborador, ya que los adenovirus, AAV1, y los demás materiales celulares encontrados en dichos cultivos no se unen de forma específica a ácido sialílico.

Además, el procedimiento de la invención también se puede aplicar fácilmente a la purificación de cualquier virus encapsidados o envuelto en una proteína que contiene sitios de unión para ácido sialílico, o a otros tipos de proteínas que contienen sitios de unión para ácido sialílico. Por ejemplo, se entenderá fácilmente que los vectores víricos que contienen proteínas de la envoltura o de la cápside quiméricas, por ejemplo, los que contienen porciones de proteína de la cápside de AAV5 y/o AAV4 que tienen sitios de unión a ácido sialílico, o vectores víricos seudotipados en una cápside de AAV4, AAV5 o quimérica, se pueden detectar, separar y aislar de acuerdo con la invención. Todavía se pueden separar, aislar, y/o purificar otros vectores víricos, proteínas quiméricas o fragmentos de proteínas de acuerdo con la invención. Teniendo en cuenta la información proporcionada en el presente documento, está claramente dentro de la capacidad de un experto en la técnica determinar si una proteína de la cápside u otra proteína seleccionada se une de forma específica a ácido sialílico. Por conveniencia a lo largo de la presente memoria descriptiva, estos vectores víricos (por ejemplo, AAV4 y AAV5) y otras proteínas que tienen sitios de unión específicos para ácido sialílico como se describe en el presente documento, se denominan "objetivos de purificación".

## MOLÉCULAS QUE CONTIENEN ÁCIDO SIÁLICO

Para su uso en la presente invención, una o más moléculas de ácido sialílico se pueden unir directa o indirectamente (por ejemplo, por medio de un enlazador adecuado) a un soporte sólido, como se define en el presente documento. De forma alternativa, se puede encontrar ácido sialílico en una variedad de moléculas proteináceas y químicas que se pueden unir (directa o indirectamente) a un soporte sólido. Dichas moléculas se pueden obtener a partir de una variedad de procedimientos naturales, sintéticos, recombinantes u otros adecuados.

Un ejemplo de una molécula proteinácea que contiene ácido sialílico es la mucina. La mucina es una proteína de mamífero presente en la saliva, el jugo intestinal y otras secreciones que son altamente ricas en ácido sialílico. Se conoce una variedad de proteínas de mucina y se pueden usar fácilmente en los procedimientos y composiciones de la invención. De forma alternativa, se pueden utilizar fácilmente fragmentos de mucinas u otras moléculas que contienen ácido sialílico. Véase, por ejemplo, Gendler S J, *et al.* Molecular cloning and expression of human tumor-associated polymorphic epithelial mucin. *J. Biol. Chem.* 265: 15286 (1990); Siddiqui J, *et al.*, Isolation and sequencing of a cDNA coding for the human DF3 breast carcinoma-associated antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2320 (1988); Ligtenberg M J L, *et al.*, Episialin, a carcinoma-associated mucin, is generated by a polymorphic gene encoding splice variants with alternative amino termini. *J. Biol. Chem.* 265: 5573 (1990) pancreas; Gum J R, *et al.* Molecular cloning of cDNAs derived from a novel human intestinal mucin gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 171: 407 (1990); small intestine, Gum J R, *et al.*, Molecular cloning of human intestinal mucin cDNAs. Sequence analysis and evidence for genetic polymorphism. *J. Biol. Chem.* 264: 6480 (1989); Gum J R, *et al.*, Molecular cloning of cDNAs derived from a novel human intestinal mucin gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 171: 407 (1990); and bronchoepithelial cell mucin, Porchet N, *et al.*, Molecular cloning and chromosomal localization of a novel human tracheo-bronchial mucin CDNA containing tandemly repeated sequences of 48 base pairs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 175: 414 (1991). Se pueden obtener secuencias para mucinas se pueden obtener a partir de una variedad de bases de datos informáticas, incluyendo GenBank y PubMed. Estas y otras mucinas se pueden purificar a partir de fuentes naturales, producir de forma recombinante o generar de forma sintética.

La síntesis química de mucina, un fragmento rico en ácido sialílico de la misma, u otros péptidos se conoce bien en la técnica, tal como la protección con TBOC o FMOC de los grupos alfa-amino. (Véase, Coligan, *et al.*, *Current Protocols in Immunology*, Wiley Interscience, 1991, Unidad 9). De forma alternativa, también se pueden sintetizar péptidos mediante los bien conocidos procedimientos de síntesis de péptidos en fase sólida (Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149 (1962); Stewart and Young, *Solid Phase Peptide Synthesis* (Freeman, San Francisco, 1969) pp. 27-62).

De forma alternativa, se puede utilizar una molécula química que contenga uno o más restos de ácido siálico, tal que la molécula química esté fijada a un soporte sólido. En aún otra alternativa, un soporte sólido para su uso en la purificación se puede modificar químicamente o de otro modo para contener un, y preferentemente más de un, resto de ácido siálico. Dichos restos de ácido siálico se pueden enlazar directamente al soporte sólido, por ejemplo, por un enlace covalente u otro unido adecuado que sustente la unión del ácido siálico al objetivo de purificación y la retirada de los materiales unidos de forma inespecífica. De forma alternativa, los restos de ácido siálico se pueden enlazar indirectamente al soporte sólido, por ejemplo, por un resto que facilite la unión de ácido siálico al soporte. Dicho resto puede ser una proteína, un resto químico, u otro enlazador adecuado.

De forma deseable, el soporte sólido y/o la molécula que contiene ácido siálico contiene ácido 2,3-O-siálico y ácido 2,3-N-siálico, o más de uno de cualquiera o ambos restos. Un soporte sólido (y/o molécula que contiene ácido siálico) contiene uno o más restos de ácido 2,3-O-siálico, es particularmente muy adecuado para su uso cuando el objetivo de purificación se deriva de AAV4. En todavía otro modo de realización, un soporte sólido (y/o molécula que contiene ácido siálico) que contiene uno o más restos de ácido 2,3-N-siálico es particularmente muy adecuado para su uso cuando el objetivo de purificación se deriva de AAV5.

Los procedimientos para fijar los restos de ácido siálico y/o las moléculas que contienen ácido siálico, directa o indirectamente, al soporte sólido son conocidos por los expertos en la técnica.

## 20 Soportes sólidos

La mucina, u otra molécula que lleva ácido siálico, se enlaza de forma deseable a un soporte sólido que se puede usar para la unión del objetivo de purificación (por ejemplo, AAV5). Por conveniencia, se hará referencia a la mucina. Sin embargo, un experto en la técnica entenderá que cualquier otra de las moléculas que llevan ácido siálico se puede sustituir en la invención. En un modo de realización particularmente deseable, la mucina está unida covalentemente al soporte sólido. Se conocen procedimientos adecuados en la técnica, y también están disponibles de los fabricantes de soportes sólidos.

Como se usa en el presente documento, el término "soporte sólido" se refiere a cualquier sustancia, incluyendo geles, resinas, perlas, polvos y otros sólidos, a la que se puede unir ácido siálico o una molécula que contiene ácido(s) siálico(s) de modo que la molécula de ácido siálico unida al soporte sólido sustente la unión del ácido siálico al objetivo de purificación y la retirada de los materiales unidos de forma inespecífica. Los ejemplos de soportes sólidos adecuados incluyen resinas compuestas por sefarosa, agarosa, agarosa reticulada, agarosa-poliacrilamida mezcladas, o poliacrileína; perlas (incluyendo micropelras); silicio; vidrio; microceldas; microcápsulas; placas de microvaloración; y biochips. Los soportes útiles incluyen los descritos en la publicación de patente internacional WO 99/27351, publicada el 3 de junio de 1999; la publicación de patente internacional WO 99/27140, publicada el 3 de junio de 1999; la patente de EE. UU. n.º 6.096.273; la publicación de patente internacional WO 00/14197, publicada el 16 de marzo de 2000, entre otros.

Se conoce una variedad de micropelras, incluyendo las perlas de aminodextrano descritas en las patentes de EE. UU. n.ºs 6.074.884; 5.945.293; y 5.658.741. También se pueden emplear partículas en dispersiones coloidales monodispersas recubiertas de aminodextrano de ferrita magnética [patente UU. n.º 5.240.640 ]; metal [patente de EE. UU. n.º 5.248.772 ]; poliestireno [patente de EE. UU. n.º 5.466.609; patente de EE. UU. n.º 5.707.877; patente de EE. UU. n.º 5.639.620; patente de EE. UU. n.º 5.776.706 ], y poliestireno-metal [patente de EE. UU. n.º 5.552.086; patente de EE. UU. n.º 5.527.713] como soportes sólidos de acuerdo con la presente invención. Otro tipo de soporte sólido puede contener el sustrato recubierto descrito anteriormente con una capa de sólido metálico de tamaño coloidal superpuesto al recubrimiento de aminodextrano. Se han descrito perlas de poliestireno-aminodextrano recubiertas de oro/plata coloidal, su preparación, caracterización y uso en análisis de subtipos de leucocitos en sangre entera. Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.248.772; la patente de EE. UU. n.º 5.552.086; la patente de EE. UU. n.º 5.945.293; O. Siiman y A. Burshteyn, J. Phys. Chem., 104:9795-9810 (2000); y O. Siiman *et al.*, Cytometry, 41:298-307 (2000). Una alternativa a este sustrato recubierto emplea partículas de poliestireno con funcionalidad carboxi como el sustrato central, recubiertas con aminodextrano por acoplamiento con EDAC como se describe en la patente de EE. UU. n.º 5.639.620. Estos y otros soportes sólidos se conocen bien por los expertos en la técnica y están disponibles a partir de una variedad de fuentes comerciales, incluyendo, sin limitación, Amersham Pharmacia (Uppsala, Suecia); Pierce; Biorad (Richmond, VA) y Beckman Coulter, entre otros.

En un modo de realización, el soporte sólido está compuesto de sefarosa activada. La sefarosa activada con CNBr se puede adquirir de Amersham Pharmacia. Sin embargo, son conocidas otras fuentes de sefarosa y sefarosa activada, como lo son los procedimientos y compuestos de activación. Los ejemplos de sefarosa activada adecuada incluyen sefarosa activada con CNBr, carbonildiimidazol, glutaraldehído, hidroxisuccinimida y cloruro de tosilo.

Los procedimientos para unir el ácido siálico, o la molécula que comprende ácido siálico (por ejemplo, mucina), al soporte sólido se pueden seleccionar de entre los procedimientos conocidos. Dichos procedimientos también están provistos por los fabricantes de los soportes sólidos.

65

En un modo de realización, el soporte sólido enlazado a mucina se carga en una columna de afinidad para la separación, aislamiento y/o purificación de una proteína que contiene sitios de unión a ácido siálico. En este modo de realización, se deja que una muestra que contiene el objetivo de purificación (por ejemplo, lisado de un cultivo celular de AAV5) fluya a través de la columna de forma que el objetivo de purificación se una de forma específica al soporte sólido enlazado a mucina. A continuación, la columna se lava para retirar el material unido de forma inespecífica, mientras se retiene el objetivo de purificación unido de forma específica. De forma deseable, el reactivo de lavado es solución salina, u otro reactivo adecuado, que está tamponado a pH fisiológico (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato). La columna se somete después a una etapa de lavado adicional en condiciones que retiran el objetivo de purificación. De forma adecuada, el reactivo de elución es una solución que contiene altas concentraciones de sal. Un ejemplo adecuado, es una solución salina tamponada con fosfato que contiene NaCl a concentraciones de al menos aproximadamente 0,1 M. Otra solución adecuada contiene solución salina tamponada con fosfato y al menos aproximadamente NaCl 0,4 M. Teniendo en cuenta esta información, un experto en la técnica puede seleccionar fácilmente una solución salina alternativa que logre un efecto similar. De forma alternativa, el reactivo de elución puede ser cualquier reactivo ácido adecuado, o sal del mismo, (por ejemplo, un reactivo que tiene un pH bajo en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 5. Los ejemplos de dichos reactivos incluyen ácido acético (por ejemplo, 1 mM) y sales del mismo tales como acetato de sodio y glicina 0,1 M (pH 3), entre otros, que serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica. Después de la elución del objetivo de purificación (por ejemplo, AAV5), el AAV5 se puede someter a concentración por técnicas convencionales.

En otro modo de realización, el soporte sólido enlazado a mucina (o el soporte sólido enlazado a otra molécula que contiene ácido siálico deseada) se puede incubar con una muestra que contiene el objetivo de purificación. En dicho modo de realización, la muestra puede ser una solución que contiene el lisado de un cultivo celular en el que se produjo la proteína que se va a aislar. De forma alternativa, la muestra puede ser una muestra biológica de un sujeto, o una muestra biológica de un sujeto mezclada con un diluyente adecuado.

Las "muestras biológicas de un sujeto" de la invención pueden incluir cualquier muestra, incluyendo, entre otros, fluidos, sangre entera, plasma o suero, donde los cuerpos formados son células, en particular glóbulos sanguíneos. Dichas muestras se pueden purificar por procedimientos convencionales, tales como separación por centrifugación, etc., para la manipulación de otras muestras de ese tipo. Estas "muestras biológicas de un sujeto" se pueden mezclar con compuestos de marcado y/o mezclar opcionalmente con tampones o diluyentes a fin de ajustar la concentración de la muestra, o preparar de otro modo la muestra para análisis. En aún otra alternativa, la muestra biológica puede ser una muestra de tejido, y el soporte sólido enlazado a mucina se puede mezclar con un tampón adecuado u otro diluyente para la incubación con la muestra de tejido.

### 35 KITS DE DIAGNÓSTICO Y PURIFICACIÓN

En otro modo de realización, la invención proporciona un kit útil para separar el objetivo de purificación. Este kit está particularmente bien adaptado para su uso en la producción de vectores víricos (por ejemplo, AAV4 o AAV5).

Típicamente, dicho kit contiene un soporte sólido que tiene ácido siálico o una molécula que contiene ácido siálico enlazado al mismo. Dichos soportes sólidos se pueden seleccionar de entre los descritos anteriormente. En un modo de realización deseable, el soporte sólido es una perla o gel para la incubación con la muestra. En otro modo de realización deseable, el soporte sólido se carga en una columna de afinidad (por ejemplo, una columna de cromatografía de líquidos), y la muestra se pasa a través de la columna.

Además, un kit de la invención también puede contener los reactivos deseados, incluyendo reactivos de lavado, reactivos de elución y reactivos de concentración. Estos reactivos se pueden seleccionar fácilmente de entre los reactivos descritos en el presente documento y de entre reactivos de concentración convencionales. En un modo de realización deseable, el reactivo de lavado es una solución salina isotónica que se ha tamponado a pH fisiológico, tal como solución salina tamponada con fosfato (PBS); el reactivo de elución es PBS que contiene NaCl 0,4 M, y dispositivos y reactivos de concentración. Por ejemplo, un experto en la técnica reconocerá que pueden ser útiles reactivos, tales como polietilenglicol (PEG), o  $\text{NH}_4\text{SO}_4$ , o los dispositivos, tales como dispositivos de filtración. Por ejemplo, un dispositivo de filtración con una membrana de 100 K concentraría rAAV.

Estos kits además pueden contener los reactivos necesarios para mantener o preservar las muestras. De forma más importante, el kit contiene instrucciones para realizar el ensayo competitivo y preparar los controles. También se pueden proporcionar en un kit diluyentes y tampones adecuados para las muestras, gráficas indicadoras para las comparaciones de señales, guantes desechables, instrucciones de descontaminación, tiras o envases de aplicadores y recipientes de preparación de muestras. Los kits también contienen preferentemente medios o sustancias tampón necesarios, según se requiera. Un experto en la técnica podría montar cualquier número de kits con la información y componentes necesarios para realizar el procedimiento en un paciente para cualquier receptor específico y célula objetivo, y comparar los resultados con los patrones para ese sitio de unión.

En todavía otro modo de realización, la invención proporciona un kit útil para detectar la presencia del objetivo de purificación (por ejemplo, AAV2/5) en una muestra. Además de los componentes descritos anteriormente, un kit de este tipo también puede contener un reactivo marcador que permita la detección visual de la unión del objetivo de

purificación a la molécula. Este kit está particularmente bien adaptado para la detección del objetivo de purificación en una muestra biológica de un sujeto, por ejemplo, la sangre. Este tipo de kit, además de contener el soporte enlazado a ácido siálico y reactivos descritos anteriormente, además puede incluir marcadores que sean visualmente detectables.

El término "marcadores" en general se refiere a moléculas, preferentemente moléculas proteínicas, pero también a pequeñas moléculas químicas, preferentemente las que sean visualmente detectables. En un ejemplo, estos marcadores posibilitan la detección emitiendo una señal detectable de una longitud de onda particular al ser excitados por un láser. Las ficobiliproteínas, los tintes en tándem, determinadas proteínas fluorescentes, pequeñas moléculas químicas y determinadas moléculas detectables por otros medios pueden considerarse en su totalidad marcadores para estos análisis. Véanse, por ejemplo, los marcadores enumerados en Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, 6.º ed., R.P. Haugland, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR (1996).

Los ejemplos de ficobiliproteínas útiles en la presente invención son ficocianina, aloficocianina (APC), aloficocianina B, ficoeritrina (PE) y preferentemente R-ficoeritrina. La PE está entre los colorantes fluorescentes más brillantes disponibles en la actualidad. Se ha usado PE conjugada a un anticuerpo para detectar interleucina-4 en un ensayo de placas fluorescentes y en M.C. Custer y M.T. Lotze, J. Immunol. Met., 128, 109-117 (1990), y se descubrió que fue el único fluoróforo sometido a prueba que producía una señal adecuada. Los tintes en tándem son moléculas no naturales que pueden estar formadas por una ficobiliproteína y otro tinte. Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 4.542.104 y la patente de EE. UU. n.º 5.272.257. Los ejemplos de tintes en tándem útiles en la presente invención son ficoeritrocianina o PC5 (PE-Cy5, ficoeritrina-cianina 5.1; excitación: 486-580 nm, emisión: 660-680 nm) [A.S. Waggoner *et al.*, Ann. N. Y. Acad. Sci., 677:185-193 (1993) y la patente de EE. UU. n.º 5.171.846 ] y ECD (ficoeritrina-rojo texas; excitación, 486-575 nm, emisión, 610-635 nm) [patente de EE. UU. n.º 4.542.104 y patente de EE. UU. n.º 5.272.257]. Otros tintes en tándem conocidos son PE-Cy7, APC-Cy5, y APC-Cy7 [M. Roederer *et al.*, Cytometry, 24:191-197 (1996)]. Los tintes en tándem, PC5 y ECD, se han conjugado directamente satisfactoriamente con anticuerpos monoclonales por varios procedimientos que implican la activación con iminotiolano del tinte. Todavía otros marcadores que se pueden conjugar directamente con un ligando y usar con las ficobiliproteínas o tintes en tándem en la presente invención para añadir números adicionales de marcadores (ligandos marcados) al procedimiento incluyen moléculas pequeñas que al ser excitadas emiten longitudes de onda de menos de 550 nm. Dichas moléculas no se superponen con las emisiones de las ficobiliproteínas. Un ejemplo de dicho marcador es isotiocianato de fluoresceína (FITC). Otros se enumeran en el Handbook citado anteriormente. Todavía otros marcadores que se pueden emplear en este procedimiento para proporcionar colores adicionales son las proteínas conocidas como proteínas verdes fluorescentes y proteínas azules fluorescentes; también pueden ser útiles los marcadores que emiten al ser excitados por luz ultravioleta. Las biliproteínas y los tintes en tándem están comercialmente disponibles a partir de diversas fuentes como Coulter International Corporation, Miami, FL, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR y Prozyme, Inc., San Leandro, CA. Los demás marcadores o etiquetas que se analizan anteriormente se pueden obtener comercialmente a partir de fuentes conocidas.

Los procedimientos para utilizar estos marcadores serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica, y pueden implicar incubar la muestra en presencia de un marcador antes de ponerla en contacto con el soporte sólido enlazado a ácido siálico. De forma alternativa, el marcador puede estar unido al soporte sólido. En aún otra alternativa, el marcador se puede incubar en el eluato que contiene el objetivo de purificación seguido de la etapa de lavado que retira el objetivo de purificación unido de forma específica del soporte sólido. La selección del marcador y el sistema de detección no son una limitación de la presente invención.

Los kits provistos por la presente invención son útiles para realizar los procedimientos descritos en el presente documento.

Se proporcionan los ejemplos siguientes para ilustrar la invención y no limitan el alcance de la misma.

Ejemplo 1 – Producción de matriz para la purificación de vectores

Para producir una matriz para la purificación por afinidad de vectores con una cápside de AAV5, se acopló mucina a sefarosa activada con CNBr.

En resumen, se acoplaron 120 mg de mucina tipo I-S (Sigma, St. Louis, MI) a 3,5 g de sefarosa activada con CNBr (Amersham Pharmacia, Uppsala, Suecia) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La resina (3,5 mg de polvo liofilizado + 120 mg de mucina) se rellenó en una columna de cromatografía de líquidos de 2,5 cm de diámetro (Sigma) y se lavó con 24 ml de PBS, pH 7,4 (Life Technologies, Grand Island, NY).

Se produjo AAV2/5 recombinante por transfección en 293 células de plásmidos que codificaban la repetición de AAV serotipo 2 y caperuza de serotipo 5 y las funciones de colaborador Ad como se describe (A. Auricchio, *et al.*, Hum Gene Ther, 12:71-76 (2001)). Las células de placas de 50 x 150 mm se recogieron, resuspendieron en 2,5 ml de DMEM libre de suero/placa y se lisaron mediante dos tandas de congelación y descongelación. El vector vírico resultante contiene las repeticiones terminales invertidas de AAV2 que flanquean el gen que indicado en la tabla 1 ( $\beta$ -galactosidasa o la proteína verde fluorescente potenciada (EGFP)) y otros elementos vectoriales, en una proteína

de la cápside de AAV serotipo 5. Antes de la aplicación sobre la columna de afinidad, el lisado que contenía el vector AAV2/5 se trató como se describe para AAV2 (Auricchio, *et al.* citado anteriormente).

5 El lisado filtrado se dejó fluir a través de la columna a una velocidad de 1gota/segundo, seguido de 2 lavados de PBS (20 ml) y elución con PBS + NaCl 0,4 M (15 ml). El eluato se concentró hasta 2-3 ml a través de un dispositivo con filtro Millipore, se lavó una vez con 15 ml de PBS y se reconcentró hasta un volumen final de 2-3 ml con tampón de intercambio.

10 La caracterización de las preparaciones del vector AAV2/5 incluyó valores físicos (copias de genoma), valores de transducción después de infecciones con diluciones limitantes de 293 células y ensayos de foco infeccioso (Tabla I). Las copias de genoma se determinaron mediante PCR en tiempo real como se describe (G. Gao, *et al.*, Hum Gene Ther, 11:2079-2091 (2000)). Se midieron las unidades infecciosas tras la infección con diluciones limitantes de una línea celular que expresaba la repetición-caperuza en presencia de adenovirus como se describe (G. Gao, *et al.*, citado anteriormente).

15

Tabla I.

Comparación de rendimientos e infectividad de AAV2/5 purificados mediante gradientes de CsCl<sub>2</sub> frente a columna de afinidad.

	N.º	Purif.	CG/ml	Rendimiento	UT/ml	CG/ UI
CMV.lacZ	AA116	CsCl <sub>2</sub>	5,2 × 10 <sup>12</sup>	1,56 × 10 <sup>13</sup>	3,8 × 10 <sup>7</sup>	288
CMV.lacZ	AA115	columna	1,8 × 10 <sup>12</sup>	8,1 × 10 <sup>12</sup>	2,1 × 10 <sup>7</sup>	180
CMV.lacZ	AA109	columna	6 × 10 <sup>11</sup>	2,4 × 10 <sup>13</sup>	1 × 10 <sup>7</sup>	300
CMV.EGF	AA72	CsCl <sub>2</sub>	1,3 × 10 <sup>12</sup>	1,95 × 10 <sup>12</sup>	2 × 10 <sup>7</sup>	928
CMV.EGF	AA131	columna	5,6 × 10 <sup>12</sup>	2,52 × 10 <sup>13</sup>	2,2 × 10 <sup>7</sup>	1600
CMV.EGF	AA 139	columna	3,8 × 10 <sup>12</sup>	2 × 10 <sup>13</sup>	4 × 10 <sup>7</sup>	1055
CMV.EGF	AA144	columna	3,2 × 10 <sup>12</sup>	9,6 × 10 <sup>12</sup>	3,8 × 10 <sup>7</sup>	547

NB. CG: copias de genoma; UT: unidades de transducción; UI: unidades infecciosas; CMV: promotor de citomegalovirus; EGFP: proteína verde fluorescente mejorada.

Ejemplo 2 - Capacidad de la invención para diferenciar entre AAV2/5 y AAV2

20 Para someter a prueba la hipótesis de que la mucina se podría unir eficazmente a vectores que portan una cápside de AAV5, se preabsorbieron partículas de AAV2/5 o AAV2 con mucina soluble y después se sometieron a prueba para determinar su infectividad en las células objetivo como sigue.

25 Se incubaron (o no) 1x10<sup>10</sup> copias de genoma (CG) de bien AAV2/5- o AAV2-CMV-EGFP durante una hora a 37 °C con 20 mg de mucina/ml en medio Eagle modificado por Dulbecco antes de la infección de 293 células. Cuarenta y ocho horas más tarde se evaluaron las células transducidas bajo microscopio de fluorescencia usando un filtro triple (que permite visualizar DAPI-FITC y rodamina).

30 Se observó que la mucina inhibió la transducción de 293 células por AAV2/5 pero no por AAV2, lo que indicaba que el componente de ácido siálico de esta proteína fue podía bloquear los sitios de unión de la cápside de AAV5. Por tanto, la invención proporciona un procedimiento para separar fácilmente AAV5 de AAV2 y otros materiales víricos proteináceos y celulares que carecen de la capacidad de unirse a ácido siálico.

35 Ejemplo 3 - Comparación *in vitro* de vectores AAV2/5 aislados mediante columna de mucina de la invención frente al procedimiento de la técnica anterior

Las características de rendimiento, transducción, eficacia e infectividad evaluadas *in vitro* son comparables entre los vectores AAV2/5 purificados usando sedimentación con CsCl<sub>2</sub> y la columna de mucina de la invención.

40 Las preparaciones AA115 y 116 se produjeron a partir de un lisado de células que contenían un vector común y se dividieron en dos fracciones iguales. Los vectores AAV2/5-CMV-lacZ bien se purificaron por purificación de AAV2/5 por CsCl<sub>2</sub> (AA116) o columna de mucina (AA115) para evaluar su capacidad de infectar epitelios humanos diferenciados de las vías respiratorias de la zona apical. Una semana después de la transducción, los vectores se purificaron por gradientes físicos o la columna de mucina de la invención, y se realizó una tinción con X-gal.

45 La pureza de los AAV2/5 purificados mediante la columna de mucina de acuerdo con la invención se comparó con la de los obtenidos por CsCl<sub>2</sub> usando gel de poliacrilamida-SDS (4-12 % de SDS PAGE) seguido por tinción con azul

- 5 Comassie para visualizar las proteínas. Las únicas bandas detectadas en las preparaciones purificadas mediante columna representan las proteínas de la cápside VP 1, 2 y 3 al contrario de lo que se observó en las preparaciones purificadas con CsCl<sub>2</sub> que contenían varias proteínas contaminantes. El número de unidades formadoras de azul (es decir, células que expresan X-gal, ufa) fue similar entre el vector purificado mediante CsCl<sub>2</sub>- (54,6 ufa/1x10<sup>10</sup> CG) y mediante columna (58 ufa/1x10<sup>10</sup> CG).
- Ejemplo 4 - Comparación *in vivo* de vectores aislados mediante columna de mucina de la Invención frente al procedimiento de la técnica anterior
- 10 Se evaluaron la infectividad de los vectores de AAV2/5 purificados mediante CsCl<sub>2</sub> (prep. AA116) y mucina (AA115) *in vivo* después de la inyección en músculos esqueléticos como sigue y se cuantificó la expresión de lacZ por ELISA de los homogeneizados o por tinción con X- gal de cortes histológicos.
- 15 A ratones macho C57B1/6 de seis semanas de edad se inyectaron en el tibial anterior de ambas patas 1 x 10<sup>11</sup> CG de AAV2-CMV-lacZ bien purificadas por columna de mucina o gradientes de CsCl<sub>2</sub>. Veintiún días después de la administración de los vectores, se extirparon los músculos derechos, se cortaron y se tiñeron con X-gal.
- 20 Se confirmó la similitud en intensidad y número de células musculares β-gal positivas a las que se administró CsCl<sub>2</sub> y los vectores purificados mediante columna de mucina de acuerdo con la invención mediante cuantificación por ELISA de la β-galactosidasa (CsCl<sub>2</sub>: N = 5, 113 ± 13 ng/ml; columna de mucina: N = 5, 183 ± 123 ng/ml).
- Esto indica que el procedimiento de purificación de la invención no tiene un impacto negativo en la infectividad de las construcciones víricas purificadas con el mismo.
- 25 Aunque la invención se ha descrito con referencia a un modo de realización particularmente preferente, se entenderá que se pueden realizar modificaciones. También se pretende que dichas modificaciones entren dentro del ámbito de las reivindicaciones adjuntas.

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para aislar un objetivo de purificación que comprende una proteína que se une de forma específica a ácido siálico, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de:
- 5 dejar que el objetivo de purificación entre en contacto con una molécula que comprende ácido siálico que se ha enlazado a un soporte sólido, por el que el objetivo de purificación que tiene un sitio de unión para ácido siálico se une de forma selectiva por la molécula, en el que el objetivo de purificación comprende una proteína de la cápside seleccionada del grupo que consiste en una proteína de la cápside de AAV serotipo 4, una proteína de la cápside de AAV serotipo 5 y una cápside que comprende un fragmento de una cápside de AAV4 o AAV5 que contiene el sitio de unión para ácido siálico.
- 10 2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la molécula que comprende ácido siálico es mucina.
- 15 3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el soporte sólido se selecciona del grupo que consiste en sefarosa, agarosa y una resina de poliacrilamida.
- 20 4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el soporte sólido es sefarosa activada con un compuesto seleccionado del grupo que consiste en CNBr, carbonildiimidazol, glutaraldehído, hidroxisuccinimida y cloruro de tosilo.
- 25 5. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el objetivo de purificación y el soporte sólido enlazado a la molécula se ponen en contacto incubando una solución que comprende el AAV y los materiales celulares y el soporte.
- 30 6. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el soporte sólido se rellena en una columna de cromatografía de líquidos.
- 35 7. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además la etapa de lavar el soporte sólido para retirar el material de la mezcla que está unido de forma inespecífica al soporte enlazado a la molécula.
8. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende además la etapa de separar el objetivo de purificación del soporte sólido.
9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, que comprende además la etapa de concentrar el objetivo de purificación separado.
- 40 10. Un procedimiento para aislar un vector vírico a partir de una mezcla, comprendiendo dicho vector vírico una proteína de la cápside seleccionada del grupo que consiste en una proteína de la cápside de AAV serotipo 4, una proteína de la cápside de AAV serotipo 5, y una cápside que comprende un fragmento de una cápside de AAV4 o AAV5 que contiene el sitio de unión para el ácido siálico, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:
- 45 a) dejar que una mezcla que contiene dicho vector vírico entre en contacto con mucina que se ha enlazado a un soporte sólido, con lo que el virus se une de forma selectiva por el soporte enlazado a mucina, y
- b) lavar el soporte sólido para retirar el material de la mezcla que se une de forma inespecífica al soporte enlazado a mucina.
- 50 11. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, que comprende además, después de la etapa de lavado (b), la etapa de separar el vector vírico del soporte sólido.
- 55 12. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la separación se realiza mediante una etapa de lavado adicional usando una solución salina concentrada.
13. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, en el que la solución salina concentrada es solución salina tamponada con fosfato y cloruro de sodio 0,4 M.
- 60 14. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, que comprende además la etapa de concentrar el vector vírico separado.
- 65 15. Un kit útil para detectar un objetivo de purificación en una mezcla, comprendiendo dicho kit un ácido siálico enlazado a un soporte sólido y un reactivo que permita la detección visual de la unión del objetivo de purificación, en el que el objetivo de purificación comprende una proteína seleccionada del grupo que consiste en una proteína de la

## ES 2 564 553 T3

cápside de AAV serotipo 4, una proteína de la cápside de AAV serotipo 5, o un fragmento de una proteína de la cápside de AAV4 o AAV5 que tiene un sitio de unión para el ácido siálico.

- 5 16. El kit de acuerdo con la reivindicación 15, en el que el soporte sólido es agarosa activada con mucina enlazada al mismo.
17. El kit de acuerdo con la reivindicación 15, en el que el soporte sólido se carga en una columna de afinidad.
- 10 18. El kit de acuerdo con la reivindicación 17, en el que la columna de afinidad es una columna de cromatografía de líquidos.
19. El kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18, en el que el kit comprende además reactivos de lavado, elución y concentración.
- 15 20. Un procedimiento de detección en una muestra la presencia de un virus con una proteína de superficie seleccionada de una proteína de la cápside de un virus adenoasociado (AAV) serotipo 4 o una proteína de la cápside de AAV serotipo 5, o un fragmento de las mismas que tiene un sitio de unión para ácido siálico, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de utilizar el kit de cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19 en una muestra para detectar visualmente la unión del virus.
- 20 21. Una composición útil en la unión de un objetivo de purificación de una mezcla que comprende al menos un resto de ácido 2-3,O-siálico y al menos un resto de ácido 2,2-N-siálico enlazado a un soporte sólido.
- 25 22. Un procedimiento de unión de un vector vírico adenoasociado (AAV) que tiene una proteína de AAV serotipo 4 o una proteína de la cápside de AAV serotipo 5 de un cultivo, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de incubar la composición de la reivindicación 21 en lisado o medio de cultivo.