

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 676 550**

51 Int. Cl.:

C12N 15/864 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.02.2012 PCT/GB2012/050376**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.08.2012 WO12114090**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.02.2012 E 12706308 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.05.2018 EP 2678435**

54 Título: **Vectores AAV para su uso en genoterapia de coroideremia**

30 Prioridad:

22.02.2011 GB 201103062

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

20.07.2018

73 Titular/es:

**OXFORD UNIVERSITY INNOVATION LIMITED
(100.0%)
Buxton Court, 3 West Way, Botley
Oxford OX2 0JB, GB**

72 Inventor/es:

**MACLAREN, ROBERT;
SEABRA, MIGUEL y
DURING, MATTHEW JOHN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

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

ES 2 676 550 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vectores AAV para su uso en genoterapia de coroideremia

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a genoterapia para el tratamiento o prevención de la coroideremia.

10 Antecedentes de la invención

10 La coroideremia es una degeneración progresiva ligada al X infrecuente de la coroides, el epitelio pigmentado de la retina y los fotorreceptores del ojo. La historia natural típica en hombres afectados es la aparición de ceguera nocturna durante la adolescencia, y después pérdida progresiva de visión periférica durante los 20 y los 30, que da lugar a ceguera completa en los 40. Las mujeres portadoras tienen síntomas leves, de forma muy destacable ceguera nocturna, pero ocasionalmente pueden tener un fenotipo más grave.

15 La enfermedad está causada por mutaciones en el gen REP1, (proteína 1 de acompañamiento de Rab), que está ubicado en la región 21q del cromosoma X. En la mayoría de las células del organismo, la proteína REP2, que es un 75 % homóloga a REP1, compensa la deficiencia de REP1. En el ojo, sin embargo, por razones que aún no están claras, REP2 no puede compensar la deficiencia de REP1. Por tanto, en el ojo, la actividad del polipéptido REP es insuficiente para mantener la prenilación normal de las proteínas diana (GTPasas Rab), que da lugar a disfunción celular y muerte final, que afecta principalmente a la retina exterior y la coroides.

20 No hay tratamiento para la coroideremia, y hay una ausencia de modelos para evaluar las estrategias terapéuticas. Existe la necesidad de proporcionar dicho tratamiento.

25 Sumario de la invención

30 La presente divulgación se refiere a un vector que puede usarse para genoterapia para coroideremia, y métodos de prevención o tratamiento de esta enfermedad usando el vector. La divulgación también se refiere al uso del vector en métodos de prevención o tratamiento de coroideremia.

35 De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona una partícula de vector de virus adenoasociado de serotipo 2 (AAV2) para su uso en el tratamiento o la prevención de coroideremia, en la que el genoma de la partícula es un genoma AAV2 que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica REP1, como se representa en la SEQ ID NO: 3 o una variante de la misma que tiene al menos un 97 % de identidad sobre la longitud completa de la SEQ ID NO: 3, en la que dicha secuencia polinucleotídica que codifica REP1 está unida de forma funcional a una secuencia promotora.

40 En una realización, el genoma es como se representa en la SEQ ID NO: 1 y/o carece de uno o más del grupo de una secuencia de repetición terminal invertida (ITR), la secuencia génica de replicación (rep) y la secuencia génica de la cápsida (cap).

45 En una realización, la REP1 tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 3.

En una realización, la secuencia polinucleotídica que codifica REP1 como se representa en la SEQ ID NO: 3 tiene al menos un 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 2 sobre su secuencia completa.

50 En una realización, el promotor es constitutivamente activo.

En una realización, la expresión a partir de dicho promotor es específica de célula retiniana.

En una realización, la partícula AAV2 comprende una o más secuencias reguladoras adicionales.

55 En una realización, el genoma comprende una secuencia que tiene al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 5 sobre su secuencia completa.

En una realización, la partícula de vector se administra por inyección retiniana, subretiniana o intravítrea directa.

60 En una realización, la partícula de vector se administra directamente al espacio subretiniano.

Breve descripción de las figuras

65 La figura 1 muestra, que el vector AAV.REP1 (AAV-CAG-REP1) puede transducir fibroblastos humanos aislados de un paciente con coroideremia (Chm) de forma eficaz. Los niveles relativos de expresión de proteína REP1 humana (hREP1) se comparan por transferencia de Western, lo que permite la cuantificación de la actividad del

vector AAV2.REP1 comparando la cantidad de hREP1 en diferentes concentraciones de lisado celular. Con respecto al marcaje, CAG es la beta actina de pollo con la secuencia potenciadora y promotora de CMV - mencionado indistintamente como "CBA" en diversas publicaciones y partes de este documento. Se muestran transferencias de Western en los paneles de la izquierda para REP1 (panel superior) y alfa-tubulina (panel inferior) como control de carga. Carril 1: 40 µg de lisado celular de fibroblasto de tipo silvestre (WT) de control. Carril 2: 40 µg de lisado celular de fibroblastos Chm. Carriles 3-6: 40, 20, 10 y 5 µg de lisado celular de fibroblastos Chm transducidos con vector AAV2.REP1. Carril 7: proteína recombinante de REP1 humana. Como la banda de 5 µg de lisado de hREP1 tiene una densidad similar a 40 µg del lisado de fibroblasto WT, el nivel de hREP1 conseguido con el vector AAV2.RP-P1 puede conseguir al menos 8 veces (40/5) los niveles de tipo silvestre normales en estas condiciones.

Como control positivo para el promotor y otras secuencias que no son de REP1 en este ensayo, también se muestran los resultados de un vector AAV de control que expresa proteína fluorescente verde (GFP) en lugar de REP1 (AAV-CAG-GFP).

Se muestran las transferencias Western en los paneles de la derecha para GFP (panel superior) y alfa-tubulina (panel inferior) como control de carga. Carril 1: 40 µg de lisado celular de fibroblasto de tipo silvestre (WT). Carril 2: 40 µg de lisado celular de fibroblastos Chm transducidos con vector AAV2.GFP (AAV-CAG-REP1). Los altos niveles de GFP mostrados confirman la eficacia de este casete de expresión de vector en la transducción de células humanas que son defectuosas en la actividad de REP 1, como sería el caso en pacientes con coroideremia.

La figura 2 muestra una evaluación de la actividad de prenilación en fibroblastos humanos WT (primera columna a la izquierda - gris claro), fibroblastos Chm (segunda columna - gris oscuro), fibroblastos Chm transducidos con vector AAV-CAG-GFP (tercera columna - blanco, control negativo) y fibroblastos Chm transducidos con AAV-CAG-REP1 (cuarta columna - blanco). El eje de ordenadas muestra la cantidad de sustrato marcado radiactivamente, sustrato [3H] GGPP transferido en pmol, que es una medida de la prenilación, la función de REP1. Las columnas muestran las barras de error, desviaciones típicas (n=4 para cada columna). Los niveles de [3H]-GGPP se midieron en 10 mg de extracto de proteína. La cuarta columna de color cian desde la izquierda confirma que la función de prenilación también se restaura a los niveles de tipo silvestre y más allá, después de la transducción con el vector AAV.REP1. Esto confirma que la proteína REP1 detectada por transferencia de Western en la figura 1 tiene la función predicha.

La figura 3 muestra que el vector AAV tiene el tropismo correcto por células de la retina exterior (fotorreceptores y coroides) después de inyección subretiniana en un modelo de ratón. El panel de la derecha muestra expresión apropiada de un marcador (flechas) de proteína fluorescente verde (GFP) en los fotorreceptores de la capa nuclear exterior (ONL) y el epitelio pigmentado de la retina (RPE) después de inyección subretiniana del vector AAV2.CBA.GFP.WPRE.BGH en el ojo de ratón. El panel de la izquierda muestra la misma imagen en escala de grises. Esto confirma que las secuencias reguladoras de AAV2.CBA.WPRE.BGH tienen capacidad de expresión transgénica altamente eficaz en las células retinianas que tienen que abordarse en pacientes con coroideremia.

La figura 4 muestra que el vector AAV.REP1 no afecta de forma adversa a la función de la retina exterior a altas dosis en la retina de ratón. Se muestran los resultados de un estudio de toxicidad con medición de un electroretinograma (ERG) seis meses después de inyección subretiniana de 2 x 1 microlitros de dosis altas (n=5) o bajas (n=4) del vector AAV.REP1 en el espacio subretiniano de ratón. Dosis baja = 1×10^{11} y dosis alta = 1×10^{12} de partículas genómicas (gp) por ml (la dosis de partida para ensayos clínicos en seres humanos es 1×10^{11} gp por ml). El vector AAV.GFP tiene un casete de expresión idéntico y también se diluye hasta la misma dosis antes de su inyección para actuar como control. El eje de ordenadas muestra el trazado de ERG a intensidades de destello crecientes que varían de respuestas de bastones escotópicas (adaptadas a la oscuridad) por encima de las respuestas de brillantes a fotópicas por debajo (que también incluirían fotorreceptores de cono). Los trazados en todos los puntos muestran amplitud de ERG similares tanto después de una dosis alta como después de una dosis baja de exposición a AAV.REP1. En el grupo de dosis alta, las amplitudes de GFP equivalentes están ligeramente reducidas, de acuerdo con el efecto marginal conocido sobre la función retiniana de GFP a niveles altos. Este efecto de GFP también actúa como control positivo para confirmar la sensibilidad de este ensayo.

Descripción de secuencias

La SEQ ID NO: 1 es una secuencia de ADN para el genoma de AAV2.

La SEQ ID NO: 2 es una secuencia de ADN que codifica la proteína Rep-1 humana, variante de transcrito 1.

La SEQ ID NO: 3 es una secuencia de aminoácidos para la proteína Rep-1 humana, variante de transcrito 1.

La SEQ ID NO: 4 es una secuencia de ADN que codifica la proteína Rep-1 humana, variante de transcrito 1, que incluye una parte de la UTR 5'.

La SEQ ID NO: 5 es una secuencia de ADN para el elemento posregulador de la hepatitis de la marmota de América (WPRE).

La SEQ ID NO: 6 es una secuencia de ADN para un promotor de beta actina de pollo (CBA).

La SEQ ID NO: 7 es una secuenciación del ADN para un sitio de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovina (poliA de bGH).

La SEQ ID NO: 8 es una secuencia de ADN para una repetición terminal invertida (ITR) 5' de AAV2.

La SEQ ID NO: 9 es una secuencia de ADN para una ITR 3' de AAV2.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un tratamiento para coroideremia. Este se basa en una estrategia de genoterapia para la enfermedad utilizando una construcción genética para suministrar un transgén para restaurar la función de REP1. La construcción genética es un vector basado en un genoma de virus adenoasociado (AAV) que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica REP1 o una variante de la misma. Esta secuencia polinucleotídica también se menciona en este documento como "transgén". Los autores de la presente invención establecieron un modelo para evaluar estrategias para el tratamiento de coroideremia y demostraron sorprendentemente el uso de un vector de la invención para abordar la disfunción celular subyacente a la enfermedad.

Vector

Genoma de AAV

El vector de la divulgación comprende, en primer lugar, un genoma de virus adenoasociados (AAV) o un derivado del mismo.

Un genoma de AAV es una secuencia polinucleotídica que codifica las funciones necesarias para la producción de una partícula vírica AAV. Estas funciones incluyen aquellas que trabajan en el ciclo de replicación y empaquetado para AAV en una célula hospedadora, incluyendo la encapsidación del genoma de AAV en una partícula vírica AAV. Los virus AAV de origen natural son defectuosos en la replicación y dependen de que se proporcionen las funciones auxiliares en *trans* para completar un ciclo de replicación y empaquetado. Por consiguiente, el genoma de AAV del vector de la invención normalmente tiene replicación defectuosa.

El genoma de AAV puede estar en forma monocatenaria, de sentido positivo o negativo, o como alternativa en forma bicatenaria. El uso de una forma bicatenaria permite evitar la etapa de replicación de ADN en la célula diana y de esa manera puede acelerar la expresión del transgén.

El genoma de AAV puede ser de cualquier serotipo o aislado obtenido de forma natural o clado de AAV. Por tanto, el genoma de AAV puede ser el genoma completo de un virus AAV de origen natural. Como saben los expertos en la materia, los virus AAV que se producen en la naturaleza pueden clasificarse de acuerdo con diversos sistemas biológicos.

Habitualmente, los virus AAV se mencionan en términos de su serotipo. Un serotipo corresponde a una subespecie variante de AAV que debido a su perfil de expresión de antígenos superficiales de la cápsida tiene una reactividad distintiva que puede usarse para distinguirlo de otras subespecies variantes. Normalmente, un virus que tiene un serotipo AAV particular no reacciona de forma cruzada de manera eficaz con anticuerpos neutralizantes específicos para cualquier otro serotipo de AAV. Los serotipos de AAV incluyen AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10 y AAV11, también serotipos recombinantes, tales como Rec2 y Rec3, recientemente identificados de cerebro de primate.

El serotipo de AAV usado en la invención es AAV2. Un genoma de AAV2 puede tener la secuencia de la SEQ ID NO: 1. Otros serotipos de interés particular para su uso en la divulgación incluyen AAV4, AAV5 y AAV8 que transducen de forma eficaz tejido en el ojo, tal como el epitelio pigmentado de la retina. El serotipo de AAV que se usa puede ser un serotipo de AAV que no es AAV4. Pueden encontrarse revisiones de los serotipos de AAV en Choi *et al.* (Curr Gene Ther. 2005; 5(3); 299-310) y Wu *et al.* (Molecular Therapy. 2006; 14(3), 316-327). Las secuencias de los genomas de AAV o de los elementos de los genomas de AAV incluyendo las secuencias ITR, los genes rep o cap para su uso en la divulgación pueden obtenerse de los siguientes números de acceso para secuencias de genoma completo de AAV: virus adenoasociado 1 NC_002077, AF063497; virus adenoasociado 2 NC_001401; virus adenoasociado 3 NC_001729; virus adenoasociado 3B NC_001863; virus adenoasociado 4 NC_001829; virus adenoasociado 5 Y18065, AF085716; virus adenoasociado 6 NC_001862; AAV aviar ATCC VR-865 AY186198, AY629583, NC_004828; AAV aviar cepa DA-1 NC_006263, AY629583; AAV bovino NC_005889, AY388617.

Los virus AAV también pueden mencionarse en términos de clados o clones. Esto se refiere a la relación filogenética de virus AAV obtenidos de forma natural, y normalmente a un grupo filogenético de virus AAV que pueden rastrearse hasta un ancestro común, e incluye todos los descendientes del mismo. Adicionalmente, los virus AAV pueden mencionarse en términos de un aislado específico, es decir, un aislado genético de un virus AAV específico encontrado en la naturaleza. La expresión aislado genético describe una población de virus AAV que ha experimentado mezcla genética limitada con otros virus AAV de origen natural, definiendo de ese modo una población reconociblemente distintiva a nivel genético.

Los ejemplos de clados y de aislados de AAV que pueden usarse en la invención incluyen: clado A: AAV1, NC_002077, AF063497, AAV6, NC_001862, Hu. 48 AY530611, Hu 43 AY530606, Hu 44 AY530607, Hu 46 AY530609

clado B: Hu. 19 AY530584, Hu. 20 AY530586, Hu 23 AY530589, Hu22, AY530588, Hu24, AY530590, Hu21, AY530587, Hu27, AY530592, Hu28, AY530593, Hu 29 AY530594, Hu63, AY530624, Hu64, AY530625, Hu13,

AY530578, Hu56, AY530618, Hu57, AY530619, Hu49, AY530612, Hu58, AY530620, Hu34, AY530598, Hu35, AY530599, AAV2, NC_001401, Hu45, AY530608, Hu47, AY530610, Hu51, AY530613, Hu52, AY530614, Hu T41 AY695378, Hu S17 AY695376, Hu T88 AY695375, Hu T71 AY695374, Hu T70 AY695373, Hu T40 AY695372, Hu T32 AY695371, Hu T17 AY695370, Hu LG15 AY695377,

5 clado C: Hu9, AY530629, Hu10, AY530576, Hull AY530577, Hu53, AY530615, Hu55, AY530617, Hu54, AY530616, Hu7, AY530628, Hu18, AY530583, Hu15, AY530580, Hu16, AY530581, Hu25, AY530591, Hu60, AY530622, Ch5, AY243021, Hu3, AY530595, Hu1, AY530575, Hu4 AY530602 Hu2, AY530585, Hu61 AY530623

10 clado d: Rh62, AY530573, Rh48, AY530561, Rh54, AY530567, Rh55, AY530568, Cy2, AY243020, AAV7, AF513851, Rh35, AY243000, Rh37, AY242998, Rh36, AY242999, Cy6, AY243016, Cy4, AY243018, Cy3, AY243019, Cy5, AY243017, Rh13 AY243013

15 clado E: Rh38, AY530558, Hu66, AY530626, Hu42, AY530605, Hu67, AY530627, Hu40, AY530603, Hu41, AY530604, Hu37, AY530600, Rh40, AY530559, Rh2, AY243007, Bb1, AY243023, Bb2, AY243022, Rh10, AY243015, Hu17, AY530582, Hu6, AY530621, Rh25, AY530557, Pi2, AY530554, Pi1, AY530553, Pi3, AY530555, Rh57, AY530569, Rh50, AY530563, Rh49, AY530562, Hu39, AY530601, Rh58, AY530570, Rh61, AY530572, Rh52, AY530565, Rh53, AY530566, Rh51, AY530564, Rh64, AY530574, Rh43, AY530560, AAV8, AF513852, Rh8, AY242997, Rh1 AY530556

clado F: Hu14 (AAV9) AY530579, Hu31, AY530596, Hu32, AY530597, aislado clonal AAV5 Y18065, AF085716, AAV 3 NC_001729, AAV 3B NC_001863, AAV4, NC_001829, Rh34, AY243001, Rh33, AY243002, Rh32 AY243003/

20 Los expertos en la materia pueden seleccionar un serotipo, clado, clon o aislado apropiado de AAV para su uso en la presente invención basándose en su conocimiento general común. Por ejemplo, se ha demostrado que la cápsida de AAV5 transduce fotorreceptores de conos de primate de forma eficaz, como se evidencia por la exitosa corrección de un defecto de visión de color heredado (Mancuso *et al.*, Nature 2009, 461:784-7).

25 Debe entenderse, sin embargo, que la divulgación también abarca el uso de un genoma de AAV de otros serotipos que pueden no haberse identificado o caracterizado aún. El serotipo de AAV determina la especificidad tisular de infección (o tropismo) de un virus AAV. Por consiguiente, los serotipos de AAV preferidos para su uso en virus AAV administrados a pacientes de acuerdo con la invención son aquellos que tienen tropismo natural por o una alta eficacia de infección de células diana dentro de la retina en degeneración en coroideremia. Por tanto, los serotipos de AAV preferidos para su uso en virus AAV administrados a pacientes son unos que infectan células de la retina neurosensorial y el epitelio pigmentado de la retina.

35 Normalmente, el genoma de AAV de un serotipo o aislado o clado obtenido de forma natural de AAV comprende al menos una secuencia de repetición terminal invertida (ITR). Una secuencia ITR actúa en *cis* para proporcionar un origen de replicación funcional, y permite la integración y escisión del vector del genoma de una célula. En realizaciones preferidas, una o más secuencias ITR flanquean la secuencia polinucleotídica que codifica Rep-1 o una variante de la misma. Las secuencias ITR preferidas son aquellas de AAV2, incluyendo aquellas de la SEQ ID NO: 8 y 9 y variantes de las mismas. El genoma de AAV normalmente también comprende genes de empaquetado, tales como los genes *rep* y/o *cap* que codifican las funciones de empaquetado para una partícula vírica AAV. El gen *rep* codifica una o más de las proteínas Rep78, Rep68, Rep52 y Rep40 o variantes de las mismas. El gen *cap* codifica una o más proteínas de la cápsida tales como VP1, VP2 y VP3 o variantes de las mismas. Estas proteínas componen la cápsida de una partícula vírica AAV. Las variantes de cápsida se analizan a continuación.

45 Un promotor estará unido de forma funcional a cada uno de los genes de empaquetado. Los ejemplos específicos de dichos promotores incluyen los promotores p5, p19 y p40 (Laughlin *et al.*, 1979, PNAS, 76:5567-5571). Por ejemplo, los promotores p5 y p19 se usan generalmente para expresar el gen *rep*, mientras que el promotor p40 se usa generalmente para expresar el gen *cap*.

50 Como se analiza anteriormente, el genoma de AAV usado en el vector de la invención puede ser, por lo tanto, el genoma completo de un virus AAV de origen natural. Por ejemplo, puede usarse un vector que comprende un genoma de AAV completo para preparar un virus AAV *in vitro*. Sin embargo, aunque dicho vector puede administrarse, en principio, a pacientes, esto se hará infrecuentemente en la práctica. Preferiblemente, el genoma de AAV se derivatizará con fines de administración a los pacientes. Dicha derivatización es convencional en la técnica y la presente invención abarca el uso de cualquier derivado conocido de un genoma de AAV, y derivados que pudieran generarse aplicando técnicas conocidas en la técnica. La derivatización del genoma de AAV y de la cápsida de AAV se revisan en Coura y Nardi (Virology Journal, 2007, 4:99), y en Choi *et al* y Wu *et al*, mencionados anteriormente.

60 Los derivados de un genoma de AAV incluyen cualquier forma truncada o modificada de un genoma de AAV que permite la expresión de un transgén Rep-1 a partir de un vector de la invención *in vivo*. Normalmente, es posible truncar el genoma de AAV de forma significativa para que incluya una secuencia vírica mínima, que aún retiene la función anterior. Esto es preferido por motivos de seguridad para reducir el riesgo de recombinación del vector con el virus de tipo silvestre, y también para evitar la activación de una respuesta inmunitaria células por la presencia de proteínas de genes víricos en la célula diana.

65 Normalmente, un derivado incluirá al menos una secuencia de repetición terminal invertida (ITR), preferiblemente más de una ITR, tal como dos ITR o más. Una o más de las ITR pueden obtenerse de genomas de AAV que tienen

diferentes serotipos, o pueden ser una ITR quimérica o mutante. Una ITR mutante preferida es una que tiene una eliminación de un *trs* (sitio de resolución terminal). Esta eliminación permite la replicación continuada del genoma para generar un genoma monocatenario que contiene tanto secuencias codificantes como secuencias complementarias, es decir, un genoma de AAV autocomplementario. Esto permite evitar la replicación de ADN en la célula diana, y además posibilita la expresión acelerada del transgén.

La una o más ITR preferiblemente flanquearan la secuencia polinucleotídica que codifica REP1 o una variante de la misma en cualquier extremo. Se prefiere la inclusión de una o más ITR para ayudar a la formación de concatámeros del vector de la invención en el núcleo de una célula hospedadora, por ejemplo, después de la conversión del ADN de vector monocatenario en ADN bicatenario por la acción de las ADN polimerasas de la célula hospedadora. La formación de dichos concatámeros episómicos protege a la construcción de vector durante la vida de la célula hospedadora, permitiendo de ese modo una expresión prolongada del transgén *in vivo*.

En realizaciones preferidas, los elementos ITR serán las únicas secuencias retenidas por el genoma de AAV natural en el derivado. Por tanto, un derivado preferiblemente no incluirá los genes *rep* y/o *cap* del genoma natural y cualquier otra secuencia del genoma natural. Esto se prefiere, por las razones descritas anteriormente, y también para reducir la posibilidad de integración del vector en el genoma de la célula hospedadora. Adicionalmente, la reducción del tamaño del genoma de AAV permite una flexibilidad aumentada en la incorporación de otros elementos de secuencia (tales como elementos reguladores) dentro del vector además del transgén.

Con referencia al genoma de AAV2 de la SEQ ID NO: 1, por lo tanto, las siguientes partes podrían retirarse en un derivado de la invención: Una secuencia de repetición terminal invertida (ITR), los genes de replicación (*rep*) y de la cápsida (*cap*) (NB: el gen *rep* en el genoma de AAV de tipo silvestre no debe confundirse con REP1, el gen humano afectado en coroideremia). Sin embargo, en algunas realizaciones, incluyendo realizaciones *in vitro*, los derivados pueden incluir uno o más genes *rep* y/o *cap* u tras secuencias víricas de un genoma de AAV. El virus AAV de origen natural se integra con una alta frecuencia en un sitio específico en el cromosoma humano 19, y muestra una frecuencia insignificante de integración aleatoria, de modo que puede tolerarse la retención de una capacidad integradora en el vector en un entorno terapéutico.

Cuando un genoma derivado comprende genes que codifican proteínas de la cápsida, es decir, VP1, VP2 y/o VP3, el derivado puede ser un derivado quimérico, reordenado o de cápsida modificada de uno o más virus AAV de origen natural. En particular, la invención abarca el suministro de secuencias de proteína de la cápsida de diferentes serotipos, clados, clones o aislados de AAV dentro del mismo vector, es decir, seudotipado.

Los derivados quiméricos, reordenados o de cápsida modificada, normalmente se seleccionarán para proporcionar una o más funcionalidades deseadas para el vector vírico. Por tanto, estos derivados pueden presentar una eficacia aumentada de suministro génico, inmunogenicidad disminuida (humoral o celular), un intervalo de tropismo alterado y/o dirección mejorada a un tipo celular particular en comparación con un vector vírico AAV que comprende un genoma de AAV de origen natural, tal como el de AAV2. La eficacia aumentada de suministro génico puede lograrse por unión mejorada al receptor o correceptor en una superficie celular, internalización mejorada, tráfico mejorado dentro de la célula y al núcleo, desvestimiento mejorado de la partícula vírica y conversión mejorada de un genoma monocatenario en una forma bicatenaria. La eficacia aumentada también puede referirse a un intervalo de tropismo alterado o dirección a una población celular específica, de modo que la dosis del vector no se diluya por la administración a tejidos donde no se necesita.

Las proteínas de la cápsida quiméricas incluyen aquellas generadas por recombinación entre dos o más secuencias codificantes de la cápsida de serotipos de AAV de origen natural. Esto puede realizarse, por ejemplo, por una estrategia de rescate de marcadores en que se cotransfectan secuencias de cápsida no infecciosas de un serotipo con secuencias de cápsida de un serotipo diferente, y se usa selección directa para seleccionar secuencias de cápsida que tengan propiedades deseadas. Las secuencias de cápsida de los diferentes serotipos pueden alterarse por recombinación homóloga dentro de la célula para producir proteínas de cápsida quiméricas novedosas.

Las proteínas de cápsida quiméricas también incluyen aquellas generadas por genomanipulación de secuencias de proteína de la cápsida para transferir dominios proteínicos de la cápsida específicos, bucles superficiales o restos de aminoácidos específicos entre dos o más proteínas de la cápsida, por ejemplo, entre dos o más proteínas de la cápsida de diferentes serotipos.

Las proteínas de la cápsida reordenadas o quiméricas también pueden generarse por reordenamiento del ADN o por PCR propensa a errores. Pueden crearse genes de la cápsida de AAV híbridos por fragmentación aleatoria de las secuencias de genes de AAV relacionados, por ejemplo, aquellos que codifican proteínas de la cápsida de múltiples serotipos diferentes y después volviendo a ensamblar posteriormente los fragmentos en una reacción de polimerasa de autocebado, que también puede causar entrecruzamientos en regiones de homología de secuencia. Puede cribarse una biblioteca de genes de AAV híbridos creados de esta manera por reordenamiento de los genes de la cápsida de varios serotipos para identificar clones víricos que tengan una funcionalidad deseada. Asimismo, puede usarse PCR propensa a error para mutar de forma aleatoria genes de la cápsida de AAV para crear una biblioteca diversa de variantes que después pueden seleccionarse para una propiedad deseada.

Las secuencias de los genes de la cápsida también pueden modificarse genéticamente para introducir eliminaciones, sustituciones o inserciones específicas con respecto a la secuencia de tipo silvestre natural. En particular, los genes de la cápsida pueden modificarse por la inserción de una secuencia de una proteína o péptido no relacionado dentro de una fase de lectura abierta de una secuencia codificante de la cápsida, o en el extremo N y/o C de una secuencia codificante de la cápsida.

La proteína o péptido no relacionado puede ser ventajosamente uno que actúe como ligando para un tipo celular particular, confiriendo de ese modo unión mejorada a una célula diana o mejorando la especificidad de la dirección del vector a una población celular particular. Un ejemplo podría incluir el uso del péptido RGD para bloquear la captación en el epitelio pigmentado de la retina y potenciar de ese modo la transducción de los tejidos retinianos circundantes (Cronin *et al.*, 2008 ARVO Abstract: D1048). La proteína no relacionada también puede ser una que ayuda a la purificación de la partícula vírica como parte del proceso de producción, es decir, una epítipo o marca de afinidad. El sitio de inserción normalmente se seleccionará para que no interfiera con otras funciones de la partícula vírica, por ejemplo, internalización, tráfico de la partícula vírica. Los expertos en la materia pueden identificar sitios adecuados para la inserción basándose en su conocimiento general común. Se divulgan sitios particulares en Choi *et al.*, mencionado anteriormente.

La invención abarca además el suministro de secuencias de un genoma de AAV en un orden y configuración diferentes al de un genoma de AAV natural. La invención también abarca el remplazo de una o más secuencias o genes de AAV con secuencias de otro virus o con genes quiméricos compuestos de secuencias de más de un virus. Dichos genes quiméricos pueden estar compuestos de secuencias de dos o más proteínas víricas relacionadas de especies víricas diferentes.

El vector de la divulgación adopta la forma de una secuencia polinucleotídica que comprende un genoma de AAV o derivado del mismo y una secuencia que codifica REP1 o una variante de la misma.

Para evitar dudas, la divulgación también proporciona una partícula vírica AAV que comprende un vector de la divulgación. Las partículas AAV de la divulgación incluyen formas de cápsida intercambiada en las que un genoma de AAV o derivado que tiene una ITR de un serotipo se empaqueta en la cápsida de un serotipo diferente. Las partículas AAV de la invención también incluyen formas de mosaico en las que una mezcla de proteínas de la cápsida no modificadas de dos o más serotipos diferentes compone la envuelta vírica. La partícula AAV también incluye formas modificadas químicamente que albergan ligandos adsorbidos a la superficie de la cápsida. Por ejemplo, dichos ligandos pueden incluir anticuerpos para dirigirlos a un receptor de superficie celular particular.

La divulgación proporciona además una célula hospedadora que comprende un vector o partícula vírica AAV de la invención.

REP1

El vector de la invención comprende además una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido REP1 como se representa en el SEQ ID NO: 3 o una variante de la misma que tiene al menos un 97 % de identidad sobre la longitud completa de la SEQ ID NO: 3. La secuencia de ADNc humana para REP1 (o proteína 1 de acompañamiento de Rab, también conocida como componente A geranilgeraniltransferasa de proteína Rab) se muestra en la SEQ ID NO: 2 y codifica la proteína mostrada en la SEQ ID NO: 3. Se muestra una secuencia de ADNc adicional para REP1 en la SEQ ID NO: 4.

Un polipéptido REP1 o variante del mismo es cualquier polipéptido que ayude a la prenilación de una proteína GTPasa Rab. La capacidad de un polipéptido REP1 o variante del mismo de ayudar a la prenilación de una proteína GTPasa Rab puede determinarse de forma rutinaria por un experto en la materia. Una secuencia polinucleotídica que codifica una variante de REP1 es cualquier secuencia que codifica una proteína que ayude a la actividad de prenilación para una GTPasa Rab-1. Preferiblemente, la secuencia codifica una proteína que ayuda a proporcionar actividad de prenilación similar o superior para GTPasa Rab-1 en comparación con el polipéptido de la SEQ ID NO: 3.

Más preferentemente, la secuencia polinucleotídica codifica la SEQ ID NO: 3 o una variante de la misma, y es una variante de la secuencia polinucleotídica de la SEQ ID NO: 2. Una variante de la SEQ ID NO: 2 o 3 puede comprender truncamientos, mutantes u homólogos de las mismas, y cualquier variante de transcrito de las mismas que codifique un polipéptido REP funcional.

Cualquier homólogo mencionado en este documento es normalmente al menos un 70 % homólogo a una región pertinente de la SEQ ID NO: 2 o 3. Un homólogo específico es el polipéptido REP2, que es un 75 % homólogo a REP1 y puede compensar funcionalmente la deficiencia de REP1.

La homología puede medirse usando métodos conocidos. Por ejemplo, el paquete UWGCG proporciona el programa BESTFIT que puede usarse para calcular la homología (por ejemplo, usado en sus ajustes por defecto) (Devereux *et al.* (1984) *Nucleic Acids Research* 12, 387-395). Los algoritmos PILEUP y BLAST pueden usarse para calcular la

homología o secuencias de alineación (normalmente en sus ajustes por defecto), por ejemplo, como se describe en Altschul S. F. (1993) *J Mol Evol* 36:290-300; Altschul, S, F *et al.* (1990) *J Mol Biol* 215:403-10. El programa informático para realizar análisis BLAST está disponible al público a través del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Se describe en este documento una secuencia variante que codifica un polipéptido que es al menos un 55 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % y más preferiblemente al menos un 95 %, 97 % o 99 % homólogo a una región pertinente de la SEQ ID NO: 3 sobre al menos 20, preferiblemente al menos 30, por ejemplo, al menos, 40, 60, 100, 200, 300, 400 o más aminoácidos contiguos, o incluso sobre la secuencia completa de la variante. La región pertinente será una que proporciona actividad funcional de REP1 en la ayuda a la actividad de prenilación para una GTPasa Rab-1.

También se describe en este documento una secuencia variante que codifica un polipéptido que tiene al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % y más preferiblemente al menos un 95 %, 97 % o 99 % de homología con la SEQ ID NO: 3 de longitud completa sobre su secuencia completa. Normalmente, la secuencia variante difiere de la región pertinente de la SEQ ID NO: 3 en al menos, o menos de, 2, 5, 10, 20, 40, 50 o 60 mutaciones (cada una de las cuales pueden ser sustituciones, inserciones o eliminaciones).

Un polipéptido Rep-1 variante puede tener un porcentaje de identidad con una región particular de la SEQ ID NO: 3 que es igual que cualquiera de los valores de porcentaje de homología específicos (es decir, puede tener al menos un 70 %, 80% o 90% y más preferiblemente al menos un 95 %, 97 % o 99 % de identidad) a través de cualquiera de las longitudes de secuencia mencionadas anteriormente.

Las variantes de la SEQ ID NO: 3 también incluyen truncamientos. Puede usarse cualquier truncamiento siempre que la variante aún puede prenilar un polipéptido de sustrato de GTPasa Rab-1. Los truncamientos normalmente se harán para eliminar secuencias que no son esenciales para la actividad de prenilación y/o no afectan a la conformación de la proteína plegada, en particular el plegamiento del sitio activo. Los truncamientos apropiados pueden identificarse de forma rutinaria por truncamiento sistémico de secuencias de longitud variable desde el extremo N o C. Los truncamientos preferidos están en el extremo N y pueden eliminar todas las demás secuencias excepto el dominio catalítico.

Las variantes de la SEQ ID NO: 3 incluyen además mutantes que tienen una o más, por ejemplo, 2, 3, 4, de 5 a 10, de 10 a 20, de 20 a 40 o más inserciones, sustituciones o eliminaciones de aminoácidos con respecto a una región particular de la SEQ ID NO: 3. Las eliminaciones e inserciones se hacen preferiblemente fuera del dominio catalítico como se describe a continuación. Las sustituciones también se hacen normalmente en regiones que no son esenciales para la actividad proteasa y/o no afectan a la conformación de la proteína plegada.

Las sustituciones preferiblemente introducen uno o más cambios conservativos, que rempazan los aminoácidos con otros aminoácidos de estructura química similar, propiedades químicas similares o volumen de cada lateral similar. Los aminoácidos introducidos pueden tener polaridad, hidrofiliidad, hidrofobicidad, basicidad, acidez, neutralidad o carga similar a los aminoácidos que rempazan. Como alternativa, el cambio conservativo puede introducir otro aminoácidos que sea aromático o alifático en el lugar de un aminoácido aromático o alifático preexistente. Los cambios conservativos de aminoácidos son bien conocidos en la técnica y pueden seleccionarse de acuerdo con las propiedades de los 20 aminoácidos principales como se define en la tabla A, a continuación.

Asimismo, las variantes preferidas de la secuencia polinucleotídica de la SEQ ID NO: 2 incluyen polinucleótidos que tienen al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % y más preferiblemente al menos un 95 %, 97 % o 99 % de homología con una región pertinente de la SEQ ID NO: 2. Preferiblemente, la variante presenta estos niveles de homología con la SEQ ID NO: 2 de longitud completa sobre su secuencia completa.

Tabla A - Propiedades químicas de aminoácidos

Ala	alifático, hidrófobo, neutro	Met	hidrófobo, neutro
Cys	polar, hidrófobo, neutro	Asn	polar, hidrófilo, neutro
Asp	polar, hidrófilo, cargado (-)	Pro	hidrófobo, neutro
Glu	polar, hidrófilo, cargado (-)	Gln	polar, hidrófilo, neutro
Phe	aromático, hidrófobo, neutro	Arg	polar, hidrófilo, cargado (+)
Gly	alifático, neutro	Ser	polar, hidrófilo, neutro
His	aromático, polar, hidrófilo, cargado (+)	Thr	polar, hidrófilo, neutro
Ile	alifático, hidrófobo, neutro	Val	alifático, hidrófobo, neutro
Lys	polar, hidrófilo, cargado (+)	Trp	aromático, hidrófobo, neutro
Leu	alifático, hidrófobo, neutro	Tyr	aromático, polar, hidrófobo

Promotores y secuencias reguladoras

El vector de la invención también incluye elementos que permiten la expresión del transgén REP1 *in vitro* o *in vivo*. Por tanto, el vector normalmente comprende una secuencia promotora unida de forma funcional a la secuencia polinucleotídica que codifica Rep-1 o una variante de la misma.

Puede usarse cualquier promotor adecuado. La secuencia promotora puede ser constitutivamente activa, es decir, funcional en cualquier fondo de célula hospedadora, o como alternativa puede ser activa únicamente en un entorno de célula hospedadora específico, permitiendo, por tanto, la expresión dirigida del transgén en un tipo celular particular. El promotor puede mostrar expresión inducible en respuesta a la presencia de otro factor, por ejemplo, un factor presente en una célula hospedadora. En cualquier caso, cuando el vector se administra para tratamiento, el promotor debe ser funcional en un fondo de células retinianas.

En algunas realizaciones, se prefiere que el promotor muestre expresión específica de células retinianas para permitir que el transgén se exprese únicamente en poblaciones de células retinianas. Por tanto, la expresión a partir del promotor puede ser específica de células retinianas, por ejemplo, confinada únicamente a células de la retina neurosensorial y el epitelio pigmentado de la retina.

Los promotores preferidos para el transgén Rep-1 incluyen el promotor de beta-actina de pollo (CBA), opcionalmente en combinación con un elemento potenciador de citomegalovirus (CME). Un promotor particularmente preferido es un promotor CBA/CAG híbrido, por ejemplo, el promotor usado en el casete de expresión rAVE (GeneDetect.com). Un promotor preferido adicional se muestra en la SEQ ID NO: 6. Los ejemplos de promotores basados en secuencias humanas que inducirían expresión génica específica de la retina incluyen la rodopsina cinasa para bastones y conos (Allocca *et al.*, 2007, J Virol 81:11372-80), PR2.1 para conos únicamente (Mancuso *et al.* 2009, Nature) y/o RPE65 para el epitelio pigmentado de la retina (Bainbridge *et al.*, 2008, N Eng J Med).

El vector de la invención también puede comprender una o más secuencias reguladoras adicionales que pueden actuar de forma pre- o postranscripcional. La secuencia reguladora puede ser parte del locus del gen REP1 natural o puede ser una secuencia reguladora heteróloga. El vector de la invención puede comprender partes de la UTR 5' o UTR 3' del transcrito REP1 natural. Por ejemplo, el polinucleótido de la SEQ ID NO: 4 incluye algunas de las secuencias UTR 5' del transcrito REP1 natural.

Las secuencias reguladoras son cualquier secuencia que facilite la expresión del transgén, es decir, actúe aumentando la expresión de un transcrito, mejore la exportación nuclear del ARNm o potencie su estabilidad. Dichas secuencias reguladoras incluyen, por ejemplo, elementos potenciadores, elementos posreguladores y sitios de poliadenilación. Un sitio de poliadenilación preferido es la señal poli-A de la hormona del crecimiento bovina que puede ser como se muestra en la SEQ ID NO: 7. En el contexto del vector de la invención dichas secuencias reguladoras serán de acción en *cis*. Sin embargo, la invención también abarca el uso de secuencias reguladoras de acción en *trans* ubicadas en construcciones genéticas adicionales.

Un elemento posregulador preferido para su uso en un vector de la invención es el elemento posregulador de la hepatitis de la marmota de América (WPRE) o una variante de la misma. La secuencia de la WPRE se proporciona en la SEQ ID NO: 5. La invención abarca el uso de cualquier secuencia variante de la WPRE que aumenta la expresión del transgén REP1 en comparación con un vector sin una WPRE. Preferentemente, las secuencias variantes presentan al menos un 70 % de homología con la SEQ ID NO: 5 sobre su secuencia completa, más preferiblemente un 75 %, 80 %, 85 %, 90 % y más preferiblemente al menos un 95 %, 97 % o 99 % de homología con la SEQ ID NO: 5 sobre su secuencia completa.

Otra secuencia reguladora que puede usarse en un vector de la presente invención es una región de adhesión al esqueleto estructural (SAR). Las secuencias reguladoras adicionales pueden seleccionarse por los expertos en la materia basándose en su conocimiento general común.

Preparación de vector

El vector de la invención puede prepararse por medios convencionales conocidos en la técnica para el suministro de vectores para genoterapia. Por tanto, pueden usarse métodos bien establecidos y públicos de transfección de dominios, empaquetado y purificación para preparar una preparación de vector adecuada.

Como se analiza anteriormente, un vector de la invención puede comprender el genoma completo de un virus AAV de origen natural además de una secuencia polinucleotídica que codifica REP1 o una variante de la misma. Sin embargo, habitualmente se usará un genoma derivatizado, por ejemplo, un derivado que tiene al menos una secuencia de repetición terminal invertida (ITR), pero que puede carecer de cualquiera de los genes AAV tales como *rep* o *cap*.

En dichas realizaciones, para proporcionar el ensamblaje del genoma derivatizado en una partícula vírica AAV, se proporcionarán construcciones genéticas adicionales que proporcionan las funciones de AAV y/o auxiliares en una

célula hospedadora en combinación con el genoma derivatizado. Estas construcciones adicionales normalmente contendrán genes que codifican proteínas estructurales de la cápsida de AAV, es decir, *cap*, VP 1, VP2, VP3 y genes que codifican otras funciones necesarias para el ciclo vital de AAV, tales como *rep*. La selección de las proteínas estructurales de la cápsida proporcionadas en la construcción adicional determinarán el serotipo del vector vírico empaquetado.

Se describe en este documento un genoma derivatizado de AAV2 en combinación con proteínas de la cápsida de AAV5 o AAV8. Este vector vírico empaquetado normalmente comprende una o más ITR de AAV2 opcionalmente como se muestra en la SEQ ID NO: 8 y/o 9, o variantes de las mismas.

Como se menciona anteriormente, los virus AAV son de replicación incompetente y por tanto normalmente también se proporcionarán funciones víricas auxiliares, preferiblemente funciones adenovíricas auxiliares en una o más construcciones adicionales para permitir la replicación de AAV.

Todas las construcciones adicionales anteriores pueden proporcionarse como plásmidos u otros elementos episómicos en la célula hospedadora, o como alternativa pueden integrarse una o más construcciones en el genoma de la célula hospedadora.

En estos aspectos, se describe en esta ocasión un método para la producción del vector de la invención. El método comprende proporcionar un vector que comprende un genoma de virus adenoasociado (AAV) o un derivado del mismo y una secuencia polinucleotídica que codifica REP1 o una variante de la misma en una célula hospedadora, y proporcionar un medio para la replicación y ensamblaje de dicho vector en una partícula vírica AAV. Preferentemente, El método comprende proporcionar un vector que comprende un derivado de un genoma de AAV y una secuencia polinucleotídica que codifica REP1 o una variante de la misma, junto con una o más construcciones genéticas adicionales que codifican funciones víricas de AAV y/o auxiliares. Normalmente, el derivado de un genoma de AAV comprende al menos una ITR. Opcionalmente, el método comprende además una etapa de purificación de las partículas víricas ensambladas. Adicionalmente, el método puede comprender una etapa de formulación de las partículas víricas para uso terapéutico.

Métodos de tratamiento y usos médicos

Como se analiza anteriormente, los autores de la presente invención han demostrado sorprendentemente que un vector de la invención puede usarse para abordar la disfunción celular subyacente a coroideremia. En particular, han demostrado que el uso del vector puede corregir el defecto de prenilación asociado con la coroideremia. Esto proporciona un medio por el que el proceso degenerativo de la enfermedad puede tratarse, detenerse, paliarse o prevenirse.

La divulgación, por lo tanto, proporciona un método de tratamiento o prevención de la coroideremia en un paciente que lo necesita, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un vector de la invención al paciente, por inyección directa retiniana, subretiniana o intravítrea. Por consiguiente, la coroideremia se trata o previene de este modo en dicho paciente.

En un aspecto relacionado, la invención proporciona el uso de un vector de la invención en un método de tratamiento o prevención de la coroideremia por administración de dicho vector a un paciente, por inyección directa retiniana, subretiniana o intravítrea. Adicionalmente, la divulgación proporciona el uso de un vector de la invención en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir la coroideremia, por inyección directa retiniana, subretiniana o intravítrea.

En todas estas realizaciones, el vector de la invención puede administrarse para prevenir la aparición de uno o más síntomas de coroideremia. El paciente puede ser asintomático. El sujeto puede tener una predisposición a la enfermedad. El método o uso puede comprender una etapa de identificación de si un sujeto está en riesgo de desarrollar o tiene, o no, coroideremia. Se administra una cantidad profilácticamente eficaz del vector a dicho sujeto. Una cantidad profilácticamente eficaz es una cantidad que previene la aparición de uno o más síntomas de la enfermedad.

Como alternativa, el vector puede administrarse una vez han aparecido los síntomas de la enfermedad en un sujeto, es decir, para curar los síntomas existentes de la enfermedad. Se administra una cantidad terapéuticamente eficaz del antagonista a dicho sujeto. Una cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad que es eficaz para mejorar uno o más síntomas de la enfermedad. Normalmente, dicha cantidad aumenta el nivel de prenilación de GTPasas Rab en el ojo. Esto puede confirmarse como se describe a continuación. Dicha cantidad también puede detener, ralentizar o invertir algo de la pérdida de visión periférica asociada con coroideremia. Dicha cantidad también puede detener, ralentizar o invertir la aparición de ceguera nocturna.

El sujeto puede ser hombre o mujer. Los hombres muestran síntomas más graves, ya que la coroideremia es una enfermedad ligada al X, pero las mujeres también presentan síntomas de la enfermedad y ocasionalmente tienen un fenotipo grave. El sujeto se identifica preferiblemente, en riesgo de, o que tiene, la enfermedad. La retina puede

mostrar el aspecto característico inicialmente de adelgazamiento de la coroides y que progresa hasta la exposición de la esclerótica subyacente en parches. Puede haber pérdida de amplitud del electroretinograma de forma periférica. En muchos casos puede haber una historia familiar de coroideremia. Habitualmente, pero no siempre, puede identificarse una mutación en el gen REP1 ubicado en el cromosoma X.

La administración del vector normalmente es por inyección directa retiniana o subretiniana. Esto incluye el suministro directo a las células de la retina neurosensorial y el epitelio pigmentado de la retina, tal como las células epiteliales o fotorreceptoras. El suministro se hace normalmente de forma directa o de forma subretiniana a la retina en degeneración en un paciente con coroideremia. El vector puede transducir las células diana anteriores sin entrar en ninguna de las otras poblaciones celulares. También puede usarse inyección intravítrea para suministrar el vector de la invención. El suministro puede no ser subretiniano y puede no ser por inyección subretiniana. El suministro puede no ser transvítreo.

La dosis de un vector de la invención puede determinarse de acuerdo con diversos parámetros, especialmente de acuerdo con la edad, el peso y el estado del paciente a tratar; la vía de administración; y el régimen requerido. De nuevo, un médico será capaz de determinar la vía de administración necesaria y la dosificación para cualquier paciente particular.

Una dosis única típica es entre 10^{10} y 10^{12} partículas de genoma, dependiendo de la cantidad de tejido retiniano restante que requiere transducción. Una partícula de genoma se define en este documento como una cápsida de AAV que contiene una molécula de ADN monocatenario que puede cuantificarse con un método específico de secuencia (tal como PCR en tiempo real). Esa dosis puede proporcionarse como una única dosis, pero puede repetirse para el otro ojo o en casos donde el vector puede no haber abordado la región correcta de la retina por cualquier razón (tal como complicación quirúrgica). El tratamiento es preferiblemente un único tratamiento permanente para cada ojo, pero pueden considerarse inyecciones repetidas, por ejemplo, en años futuros y/o con diferentes serotipos de AAV. También se describe en este documento,

un método de control del tratamiento o prevención de coroideremia en un paciente, que comprende medir la actividad de prenilación *ex vivo* en células retinianas obtenidas de dicho paciente después de la administración del vector AAV de la invención por inyección directa retiniana, subretiniana o intravítrea. Este método permite la determinación de la eficacia del tratamiento.

Composiciones farmacéuticas

El vector de la invención puede formularse en composiciones farmacéuticas. Estas composiciones pueden comprender, además del vector, un excipiente, vehículo, un tampón, estabilizante u otros materiales farmacéuticamente aceptables bien conocidos para los expertos en la materia. Dichos materiales no deben de ser tóxicos y no deben interferir con la eficacia del ingrediente activo. La naturaleza precisa del vehículo u otro material puede determinarse por los expertos de acuerdo con la vía de administración, es decir, en este caso inyección directa retiniana, subretiniana o intravítrea.

La composición farmacéutica normalmente está en forma líquida. Las composiciones farmacéuticas líquidas generalmente incluyen un vehículo líquido tal como agua, petróleo, aceites animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético. Puede incluirse solución salina fisiológica, cloruro de magnesio, dextrosa u otra solución de sacárido o glicoles tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol. En algunos casos, puede usarse un tensioactivo, tal como ácido plurónico (PF68) al 0,001 %.

Para la inyección en el sitio afectado, el ingrediente activo estará en forma de una solución acuosa que es apirógena y tiene pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Los expertos en la técnica serán capaces de preparar soluciones adecuadas usando, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como inyección de cloruro de sodio, solución de Ringer, solución de Ringer lactato. Pueden incluirse conservantes, estabilizantes, tampones, antioxidantes y/u otros aditivos, según lo necesario.

Para liberación retardada, el vector puede incluirse en una composición farmacéutica que se formula para liberación lenta, tal como en microcápsulas formadas de polímeros biocompatibles o en sistemas de vehículo liposómicos de acuerdo con métodos conocidos en la técnica.

Ejemplos

Los presentes ejemplos describen un modelo para ensayar las estrategias terapéuticas para coroideremia y la corrección del fenotipo de enfermedad. Se muestran construcciones genéticas, que consisten en un promotor, el ADNc REP1 y elementos reguladores 3', cuando se empaquetan en un vector vírico recombinante, para transducir de forma eficaz células diana dentro de la retina en degeneración.

Ejemplo 1

Clonación del ADNc de REP1 humana y generación del casete de expresión CBA-REP-1-WPRE, construcción de pAAV-CBA-REP-1-WPRE-bGHpA y empaquetado del virus AAV REP-1.

Se aisló un ADNc de REP1 humana de una biblioteca de ADNc humano usando amplificación por PCR y cebadores homólogos a la secuencia REP1 conocida. El ADNc aislado se secuenció y demostró ser homólogo a la variante 1 traducida conocida de la secuencia de ARNm de REP1 depositada en GenBank, número de acceso NM_000390. El ADNc tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 4.

Este ADNc se insertó en un plásmido AAV cis, llamado pAM. El pAM es un plásmido de alto número de copias originalmente obtenido de pBR322, pero incluye las repeticiones terminales invertidas izquierda y derecha de AAV-2 estabilizadas que flanquean el casete de expresión de elección. Para el vector AAV-REP1, se usó un promotor CBA/CAG modificado (beta-actina de pollo con potenciador de CMV) para dirigir la expresión de REP1 y una secuencia WPRE modificada y se proporcionó poli-A 3' al ADNc. Este plásmido se llamó pAAV2-CBA-hREP-1-WPRE-bGH, (pAAV-REP-1).

El pAAV-REP-1 se usó para generar AAV-Rep-1 recombinante usando métodos bien establecidos y públicos de triple transfección de dominio, empaquetado y purificación. Las reservas de vector generadas usando este método variaban en la valoración genómica, pero muy habitualmente las reservas obtenidas después de la purificación eran de 10^{12} - 10^{13} gp/ml (gp = partículas de genoma - véase anteriormente). Las reservas se diluyeron posteriormente para uso *in vivo* como se describe a continuación.

Ejemplo 2

Expresión de REP1 a partir del vector en células de coroideremia humana (Chm)

Se evaluó la expresión de REP1 a partir del vector AAV2 REP1 en fibroblastos de coroideremia humana (Chm). Estos fibroblastos se obtuvieron con el consentimiento ético para una biopsia de piel obtenida de un paciente con coroideremia. La expresión de GFP a partir de un vector de control sirvió como control. Como preludeo del trabajo con células humanas, también se confirmó la expresión después de inyección subretiniana del vector AAV.REP1 en ratones por transferencia Western, ya que la sonda de anticuerpo reconoce las formas humanas, pero no de ratón, de la proteína REP1.

Los resultados se muestran en la figura 1. REP1 no se detectó por inmunotransferencia con un anticuerpo anti-hREP1 en fibroblastos Chm no transducidos (carril 2), mientras que REP1 se detecta en fibroblastos normales (WT = de tipo silvestre humano) (carril 1). Después de la transducción con el vector AAV2.REP1, a dosis iguales de 40 μ g de lisado y dilución hasta 5 μ g, puede observarse que el nivel de hREP1 expresada por el vector AAV2 REP1 en células Chm es aproximadamente diez veces mayor (carriles 3-6) que los niveles en células de tipo silvestre (carril 1). No se observaron efectos tóxicos sobre el crecimiento celular con este grado de sobreexpresión.

Ejemplo 3

Corrección del defecto de prenilación por el vector en células Chm

Los ratones con coroideremia no tienen un fenotipo de degeneración de la retina de la misma manera que los pacientes humanos de modo que no es posible realizar una evaluación directa del rescate de la retina usando una estrategia de genoterapia. Por esta razón, se evaluó la corrección del fenotipo de enfermedad en células Chm humanas *in vitro*.

Los resultados se muestran en la figura 2. La transducción con el AAV2.REP1 demostró una corrección del defecto de prenilación observado en células Chm, que eleva la actividad de prenilación hasta niveles significativamente mayores que los normales después de tratamiento de 2×10^5 células con 1.5×10^{10} partículas de genoma vírico de AAV2.REP1. Esto confirma que el vector AAV2.REP1 expresa la proteína REP1 funcional en células humanas afectadas por coroideremia.

En más detalle, la actividad de prenilación normal en fibroblastos de tipo silvestre (WT) produce aproximadamente 0,32 pmol de [3H]-GGPP; en fibroblastos de coroideremia (Chm) esta se reduce hasta 0,19 pmol. Como se esperaba, la actividad de prenilación estuvo inalterada después de la transducción de los fibroblastos Chm con el vector de control AAV.GFP. Después de la transducción con el vector AAV2.REP1, sin embargo, la actividad de prenilación aumentó significativamente hasta producir 0,42 pmol de [3H]-GGPP (n=4, p<0.01).

Ejemplo 4

Expresión in vivo dirigida del gen indicador a partir del vector en ratones

- 5 Para confirmar la actividad ubicua del promotor CBA y las secuencias reguladoras en el vector AAV2, se reemplazó el gen que codifica REP1 con un gen indicador que codifica proteína fluorescente verde (GFP) para crear AAV2.CBA.GFP.WPRE.BGH (AAV2.GFP). Se seleccionó GFP para evaluar la expresión *in vivo*, ya que aunque es fácil de identificar en transferencias de Western, la proteína REP1 humana no se detecta fácilmente por inmunohistoquímica indirecta en secciones de retina.
- 10 La construcción AAV2.GFP se inyectó en el espacio subretiniano de ratón y se controló la expresión de GFP por microscopía. Los resultados se muestran en la figura 3, que confirma que el vector tenía el tropismo predicho tanto por la retina neurosensorial como por el epitelio pigmentado de la retina. Esto confirma que la secuencia de la cápsida y los elementos reguladores dan lugar a altos niveles de expresión génica en fotorreceptores y el epitelio pigmentado de la retina.

Ejemplo 5

Estudio de toxicidad

- 20 Se inyectaron dosis de vector AAV2.REP1 en el espacio subretiniano de ratones de tipo silvestre (n=9) para determinar cualquier posible efecto tóxico en la función de la retina a dosis muy elevadas. Se ensayaron concentraciones de vector en ratones (1×10^{11} y 1×10^{12} gp por ml) que eran una unidad logarítmica mayores que las concentraciones alta y baja propuestas a usar en pacientes (10^{10} y 10^{11} gp por ml).
- 25 Los resultados se muestran en la figura 4. No se detectaron efectos tóxicos en el electroretinograma (ERG) seis meses después de la inyección subretiniana con la dosis alta (n=5) o baja (n=4) del vector AAV.REP1. Para controlar cualquier efecto no específico de cirugía de la retina o el vector AAV2, el otro ojo obtuvo una inyección subretiniana y valor de AAV2.GFP muy similares.
- 30 A la dosis más elevada de AAV2.GFP hubo una reducción leve en la amplitud de ERG, que refleja un efecto tóxico conocido leve usando la dosis máxima de vector que expresa GFP con este promotor fuerte, y confirma la sensibilidad de este ensayo en detectar un efecto relacionado con la dosis. No obstante, no hubo reducción detectable de ERG en los ojos tratados con AAV2.REP1 a cualquier dosis que sugiriera que la sobreexpresión de REP1 en la retina era menos tóxica que la de GFP.

Listado de secuencias

- <110> ISIS INNOVATION LIMITED
- 40 <120> MÉTODO
- <130> N.112542A LPC
- <150> GB 1103062.4
- 45 <151> 22-02-2011
- <160> 9
- <170> PatentIn versión 3.5
- 50 <210> 1
- <211> 4679
- <212> ADN
- <213> virus adenoasociado 2
- 55 <400> 1

ES 2 676 550 T3

ttggcactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcaactgagg ccgggcgacc aaaggtcgcc	60
cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgag agaggggagtg	120
gccaactcca tcactagggg ttctctggagg ggtggagtgc tgacgtgaat tacgtcatag	180
ggttagggag gtcctgtatt agaggtcacg tgagtgtttt gcgacatttt gcgacaccat	240
gtggtcacgc tgggtattta agcccagagtg agcacgcagg gtctccattt tgaagcggga	300
ggtttgaacg cgcagccgcc atgccggggt tttacgagat tgtgattaag gtccccagcg	360
accttgacga gcatctgcc ggcatctctg acagctttgt gaactgggtg gccgagaag	420
aatgggagt gcccagat tctgacatgg atctgaatct gattgagcag gcaccctga	480
ccgtggccga gaagctgcag cgcgactttc tgacggaatg gcgccgtgtg agtaaggccc	540
cggaggccct tttctttgtg caatttgaga agggagagag ctacttccac atgcacgtgc	600
tcgtggaac caccggggtg aaatccatgg ttttgggacg tttcctgagt cagattcgcg	660
aaaaactgat tcagagaatt taccgcgga tcgagccgac tttgccaaac tggttcgcgg	720
tcacaaagac cagaaatggc gccggaggcg ggaacaagggt ggtggatgag tgctacatcc	780
ccaattactt gctccccaaa acccagcctg agctccagtg ggcgtggact aatatggaac	840
agtatttaag cgcctgtttg aatctcacgg agcgtaaacg gttggtggcg cagcatctga	900
cgcacgtgtc gcagacgcag gagcagaaca aagagaatca gaatcccaat tctgatgcgc	960
cggatgatcag atcaaaaact tcagccaggt acatggagct ggtcgggtgg ctctgtggaca	1020
aggggattac ctcgagaag cagtggatcc aggaggacca ggcctcatak atctccttca	1080
atgcggcctc caactcgcgg tcccaaatca aggctgcctt ggacaatgcg ggaaagatta	1140
tgagcctgac taaaaccgcc cccgactacc tgggtgggcca gcagcccgtg gaggacattt	1200
ccagcaatcg gatttataaa attttggaaac taaacgggta cgatcccaaa tatgcggctt	1260

ES 2 676 550 T3

ccgtctttct gggatgggcc acgaaaaagt tccgcaagag gaacaccatc tggctgtttg 1320
 ggctgcaac taccgggaag accaacatcg cggaggccat agcccacact gtgcccttct 1380
 acgggtgctg aaactggacc aatgagaact ttcccttcaa cgactgtgtc gacaagatgg 1440
 tgatctggtg ggaggagggg aagatgaccg ccaaggtcgt ggagtcggcc aaagccattc 1500
 tcggaggaag caaggtgctg gtggaccaga aatgcaagtc ctcggcccag atagaccoga 1560
 ctcccgtgat cgtcacctcc aacaccaaca tgtgcgccgt gattgacggg aactcaacga 1620
 ccttcaaca ccagcagccg ttgcaagacc ggatgttcaa atttgaactc acccgccgtc 1680
 tggatcatga ctttgggaag gtcaccaagc aggaagtcaa agactttttc cggtgggcaa 1740
 aggatcacgt ggttgagggtg gagcatgaat tctacgtcaa aaaggggtga gccaaagaaa 1800
 gacccgccc cagtgcgca gatataagt agcccaaacg ggtgcgcgag tcagttgctc 1860
 agccatcgac gtcagacgct gaagcttoga tcaactacgc agacaggtac caaaacaaat 1920
 gttctcgtca cgtgggcatg aatctgatgc tgtttccctg cagacaatgc gagagaatga 1980
 atcagaattc aaatatctgc ttactcacg gacagaaaga ctgttttagag tgctttccc 2040
 tgcagaatc tcaaccggtt tctgtcgtca aaaaggcgtc tcagaaactg tgctacattc 2100
 atcatatcat gggaaagggtg ccagacgctt gcaactgctg cgatctggtc aatgtggatt 2160
 tggatgactg catctttgaa caataaatga tttaaatcag gtatggctgc cgatggttat 2220
 cttccagatt ggctcgagga cactctctct gaaggaataa gacagtgggtg gaagctcaa 2280
 cctggcccac caccacaaa gcccgagag cggcataagg acgacagcag ggtcttctgtg 2340
 cttcctgggt acaagtacct cggaccctc aacggactcg acaagggaga gccgggtcaac 2400
 gaggcagacg ccgcccctt cgagcacgac aaagcctacg accggcagct cgacagcgg 2460
 gacaaccgtt acctcaagta caaccacgcc gacgcggagt ttcaggagcg ccttaaagaa 2520
 gatagctctt ttgggggcaa cctcggacga gcagtcttcc aggcgaaaaa gagggttctt 2580
 gaacctctgg gcctggttga ggaacctgtt aagacggctc cgggaaaaaa gaggccggta 2640
 gagcactctc ctgtggagcc agactcctcc tcgggaaccg gaaaggcggg ccagcagcct 2700
 gcaagaaaaa gattgaattt tggtcagact ggagacgcag actcagtacc tgacccccag 2760
 cctctcggac agccaccagc agccccctc ggtctgggaa ctaatacgat ggctacaggc 2820
 agtggcgcac caatggcaga caataacgag ggcgcccagc gagtgggtaa ttcctcggga 2880
 aattggcatt gcgattccac atggatgggc gacagagtca tcaccaccag caccogaacc 2940
 tgggcccctg ccacctaca caaccacctc tacaacaaa tttccagcca atcaggagcc 3000
 tcgaacgaca atcactactt tggctacagc accccttggg ggtattttga cttcaacaga 3060
 ttccactgcc acttttcacc acgtgactgg caaagactca tcaacaaca ctggggattc 3120
 cgaccaaga gactcaactt caagctctt aacattcaag tcaaagaggt cacgcagaat 3180

ES 2 676 550 T3

gacggtacga cgacgattgc caataacctt accagcacgg ttcaggtggt tactgactcg 3240
gagtaccagc tcccgtagct cctcggctcg gcgcatcaag gatgcctccc gccgttccca 3300
gcagacgtct tcatggtgcc acagtatgga tacctcacc tgaacaacgg gagtcaggca 3360
gtaggacgct cttcatttta ctgcctggag tactttcctt ctcagatgct gcgtaccgga 3420
aacaacttta ccttcagcta cacttttgag gacgttcctt tccacagcag ctacgctcac 3480
agccagagtc tggaccgtct catgaatcct ctcacgacc agtacctgta ttacttgagc 3540
agaacaaaca ctccaagtgg aaccaccacg cagtcaaggc ttcagttttc tcaggccgga 3600
gcgagtgaca ttcgggacca gtctaggaac tggcttcctg gaccctgta ccgccagcag 3660
cgagtatcaa agacatctgc ggataacaac aacagtgaat actcgtggac tggagctacc 3720
aagtaccacc tcaatggcag agactctctg gtgaatccgg gcccgccat ggcaagccac 3780
aaggacgatg aagaaaagtt ttttcctcag agcggggttc tcatctttgg gaagcaaggc 3840
tcagagaaaa caaatgtgga cattgaaaag gtcatgatta cagacgaaga ggaaatcagg 3900
acaaccaatc ccgtggctac ggagcagtat ggttctgtat ctaccaacct ccagagaggc 3960
aacagacaag cagctaccgc agatgtcaac acacaaggcg ttcttccagg catggtctgg 4020
caggacagag atgtgtacct tcaggggccc atctgggcaa agattccaca cacggacgga 4080
cattttcacc cctctcccct catgggtgga ttcggactta aacaccctcc tccacagatt 4140
ctcatcaaga acaccccggc acctgcgaat ccttcgacca ccttcagtgc ggcaaagttt 4200
gcttccttca tcacacagta ctccacggga caggtcagcg tggagatcga gtgggagctg 4260
cagaaggaaa acagcaaacg ctggaatccc gaaattcagt aacttccaa ctacaacaag 4320
tctgttaatg tggactttac tgtggacact aatggcgtgt attcagagcc tcgccccatt 4380
ggcaccagat acctgactcg taatctgtaa ttgcttgta atcaataaac cgtttaattc 4440
gtttcagttg aactttggtc tctgcgtatt tctttcttat ctagtttcca tggctacgta 4500
gataagtagc atggcggggt aatcattaac tacaaggaac ccctagtgat ggagttggcc 4560
actccctctc tgcgcgctcg ctgcctcact gaggccgggc gaccaaaggt cgcccgacgc 4620
ccgggctttg cccgggaggc ctcagtgagc gagcgagcgc gcagagaggg agtggccaa 4679

<210> 2
<211> 1962
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 2

atggcgggata ctctcccttc ggagtttgat gtgatcgtaa tagggacggg tttgcctgaa 60
tccatcattg cagctgcatg ttcaagaagt ggccggagag ttctgcatgt tgattcaaga 120
agctactatg gaggaaactg ggccagtttt agcttttcag gactattgtc ctggctaaaag 180

5

10

ES 2 676 550 T3

gaataccagg aaaacagtga cattgtaagt gacagtccag tgtggcaaga ccagatcctt 240
 gaaaatgaag aagccattgc tcttagcagg aaggacaaaa ctattcaaca tgtggaagta 300
 ttttgttatg ccagtcagga tttgcatgaa gatgtcgaag aagctggtgc actgcagaaa 360
 aatcatgctc ttgtgacatc tgcaaaactcc acagaagctg cagattctgc cttcctgcct 420
 acggaggatg agtcattaag cactatgagc tgtgaaatgc tcacagaaca aactccaagc 480
 agcgatccag agaatgcgct agaagtaaat ggtgctgaag tgacagggga aaaagaaaac 540
 cattgtgatg ataaaacttg tgtgccatca acttcagcag aagacatgag tgaaaatgtg 600
 cctatagcag aagataccac agagcaacca aagaaaaaca gaattactta ctcacaaatt 660
 attaaagaag gcaggagatt taatattgat ttagtatcaa agctgctgta ttctcgagga 720
 ttactaattg atcttctaata caaatctaata gttagtcgat atgcagagtt taaaaatatt 780
 accaggattc ttgcatttcg agaaggacga gtggaacagg ttccgtgttc cagagcagat 840
 gtctttaata gcaaacact tactatggta gaaaagcgaa tgctaatagaa atttcttaca 900
 ttttgtatgg aatatgagaa atatcctgat gaatataaag gatatgaaga gatcacattt 960
 tatgaatatt taaagactca aaaattaacc cccaacctcc aatatattgt catgcattca 1020
 attgcaatga catcagagac agccagcagc accatagatg gtctcaaagc taccaaaaaac 1080
 tttcttcact gtcttggggc gtatggcaac actccatttt tgtttccttt atatggccaa 1140
 ggagaactcc cccagtgttt ctgcaggatg tgtgctgtgt ttggtggaat ttattgtctt 1200
 cgccattcag tacagtgcct tgtagtggac aaagaatcca gaaaatgtaa agcaattata 1260
 gatcagtttg gtcagagaat aatctctgag catttcctcg tggaggacag ttactttcct 1320
 gagaacatgt gctcacgtgt gcaatacagg cagatctcca gggcagtgct gattacagat 1380
 agatctgtcc taaaaacaga ttcagatcaa cagatttcca ttttgacagt gccagcagag 1440
 gaaccaggaa cttttgctgt tcgggtcatt gagttatggt cttcaacgat gacatgcatg 1500
 aaaggcacct atttggttca tttgacttgc acatcttcta aaacagcaag agaagattta 1560
 gaatcagttg tgcagaaatt gtttgttcca tatactgaaa tggagataga aaatgaacaa 1620
 gtagaaaagc caagaattct gtgggctctt tacttcaata tgagagattc gtcagacatc 1680
 agcaggagct gttataatga tttaccatcc aacgtttatg tctgctctgg cccagattgt 1740
 ggtttaggaa atgataatgc agtcaaacag gctgaaacac ttttccagga aatctgcccc 1800
 aatgaagatt tctgtcccc tccaccaaact cctgaagaca ttatccttga tggagacagt 1860
 ttacagccag aggcttcaga atccagtgcc ataccagagg ctaactcgga gactttcaag 1920
 gaaagcacia accttggaac cctagaggag tcctctgaat aa 1962

<210> 3
<211> 653
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 3

ES 2 676 550 T3

Met Ala Asp Thr Leu Pro Ser Glu Phe Asp Val Ile Val Ile Gly Thr
1 5 10 15

Gly Leu Pro Glu Ser Ile Ile Ala Ala Ala Cys Ser Arg Ser Gly Arg
20 25 30

Arg Val Leu His Val Asp Ser Arg Ser Tyr Tyr Gly Gly Asn Trp Ala
35 40 45

Ser Phe Ser Phe Ser Gly Leu Leu Ser Trp Leu Lys Glu Tyr Gln Glu
50 55 60

Asn Ser Asp Ile Val Ser Asp Ser Pro Val Trp Gln Asp Gln Ile Leu
65 70 75 80

Glu Asn Glu Glu Ala Ile Ala Leu Ser Arg Lys Asp Lys Thr Ile Gln
85 90 95

His Val Glu Val Phe Cys Tyr Ala Ser Gln Asp Leu His Glu Asp Val
100 105 110

Glu Glu Ala Gly Ala Leu Gln Lys Asn His Ala Leu Val Thr Ser Ala
115 120 125

Asn Ser Thr Glu Ala Ala Asp Ser Ala Phe Leu Pro Thr Glu Asp Glu
130 135 140

Ser Leu Ser Thr Met Ser Cys Glu Met Leu Thr Glu Gln Thr Pro Ser
145 150 155 160

Ser Asp Pro Glu Asn Ala Leu Glu Val Asn Gly Ala Glu Val Thr Gly
165 170 175

Glu Lys Glu Asn His Cys Asp Asp Lys Thr Cys Val Pro Ser Thr Ser
180 185 190

Ala Glu Asp Met Ser Glu Asn Val Pro Ile Ala Glu Asp Thr Thr Glu
195 200 205

Gln Pro Lys Lys Asn Arg Ile Thr Tyr Ser Gln Ile Ile Lys Glu Gly
210 215 220

Arg Arg Phe Asn Ile Asp Leu Val Ser Lys Leu Leu Tyr Ser Arg Gly

ES 2 676 550 T3

Glu Pro Gly Thr Phe Ala Val Arg Val Ile Glu Leu Cys Ser Ser Thr
 485 490 495

Met Thr Cys Met Lys Gly Thr Tyr Leu Val His Leu Thr Cys Thr Ser
 500 505 510

Ser Lys Thr Ala Arg Glu Asp Leu Glu Ser Val Val Gln Lys Leu Phe
 515 520 525

Val Pro Tyr Thr Glu Met Glu Ile Glu Asn Glu Gln Val Glu Lys Pro
 530 535 540

Arg Ile Leu Trp Ala Leu Tyr Phe Asn Met Arg Asp Ser Ser Asp Ile
 545 550 555 560

Ser Arg Ser Cys Tyr Asn Asp Leu Pro Ser Asn Val Tyr Val Cys Ser
 565 570 575

Gly Pro Asp Cys Gly Leu Gly Asn Asp Asn Ala Val Lys Gln Ala Glu
 580 585 590

Thr Leu Phe Gln Glu Ile Cys Pro Asn Glu Asp Phe Cys Pro Pro Pro
 595 600 605

Pro Asn Pro Glu Asp Ile Ile Leu Asp Gly Asp Ser Leu Gln Pro Glu
 610 615 620

Ala Ser Glu Ser Ser Ala Ile Pro Glu Ala Asn Ser Glu Thr Phe Lys
 625 630 635 640

Glu Ser Thr Asn Leu Gly Asn Leu Glu Glu Ser Ser Glu
 645 650

<210> 4
 <211> 1992
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 4

gatatcgaat tcctgcagcc cggcggcacc atggcggata ctctcccttc ggagtttgat 60
 gtgatcgtaa tagggacggg tttgcoctgaa tccatcattg cagctgcatg ttcaagaagt 120
 ggccggagag ttctgcatgt tgattcaaga agctactatg gaggaaactg ggccagtttt 180
 agcttttcag gactattgtc ctggctaaag gaataccagg aaaacagtga cattgtaagt 240
 gacagtccag tgtggcaaga ccagatcctt gaaaatgaag aagccattgc tcttagcagg 300
 aaggacaaaa ctattcaaca tgtggaagta ttttgttatg ccagtcagga tttgcatgaa 360
 gatgtcgaag aagctggtgc actgcagaaa aatcatgctc ttgtgacatc tgcaaaactcc 420

5

10

ES 2 676 550 T3

acagaagctg cagattctgc cttcctgcct acggaggatg agtcattaag cactatgagc 480
 tgtgaaatgc tcacagaaca aactccaagc agcgatccag agaatgcgct agaagtaa 540
 ggtgctgaag tgacagggga aaaagaaaac cattgtgatg ataaaacttg tgtgccatca 600
 acttcagcag aagacatgag tgaaaatgtg cctatagcag aagataccac agagcaacca 660
 aagaaaaaca gaattactta ctcaaaaatt attaaagaag gcaggagatt taatattgat 720
 ttagtatcaa agctgctgta ttctcgagga ttactaattg atcttcta atcaaatcta 780
 gttagtogat atgcagagtt taaaaatatt accaggattc ttgcatttcg agaaggacga 840
 gtggaacagg ttccgtgttc cagagcagat gtctttaata gcaacaact tactatggta 900
 gaaaagcgaa tgctaatgaa atttcttaca ttttgatgg aatatgagaa atctctgat 960
 gaatataaag gatatgaaga gatcacattt tatgaatatt taaagactca aaaattaacc 1020
 cccaacctcc aatatattgt catgcattca attgcaatga catcagagac agccagcagc 1080
 accatagatg gtctcaaagc taccaaaaac tttcttctact gtcttgggcg gtatggcaac 1140
 actccatttt tgtttccttt atatggccaa ggagaactcc cccagtgttt ctgcaggatg 1200
 tgtgctgtgt ttggtggaat ttattgtctt cgccattcag tacagtgcct tgtagtggac 1260
 aaagaatcca gaaaatgtaa agcaattata gatcagtttg gtcagagaat aatctctgag 1320
 catttcctcg tggaggacag ttactttcct gagaacatgt gctcacgtgt gcaatacagg 1380
 cagatctcca gggcagtgct gattacagat agatctgtcc taaaaacaga ttcagatcaa 1440
 cagatctcca ttttgacagt gccagcagag gaaccaggaa cttttgctgt tcgggtcatt 1500
 gagttatggt cttcaacgat gacatgcatg aaaggcacct atttggttca tttgacttgc 1560
 acatcttcta aaacagcaag agaagattta gaatcagttg tgcagaaatt gtttgttcca 1620
 tatactgaaa tggagataga aatgaacaa gtagaaaagc caagaattct gtgggctctt 1680
 tacttcaata tgagagattc gtcagacatc agcaggagct gttataatga tttaccatcc 1740
 aacgtttatg tctgctctgg cccagattgt ggtttaggaa atgataatgc agtcaaacag 1800
 gctgaaacac ttttccagga aatctgcccc aatgaagatt tctgtcccc tccaccaaat 1860
 cctgaagaca ttatccttga tggagacagt ttacagccag aggcttcaga atccagtgcc 1920
 ataccagagg ctaactcgga gactttcaag gaaagcacia accttggaaa cctagaggag 1980
 tcctctgaat aa 1992

5 <210> 5
 <211> 588
 <212> ADN
 <213> virus de la hepatitis B de la marmota de América

10 <400> 5

ES 2 676 550 T3

atcaacctct ggattacaaa atttgtgaaa gattgactgg tattcttaac tatgttgctc 60
 cttttacgct atgtggatac gctgctttaa tgcctttgta tcatgctatt gcttcccgta 120
 tggctttcat tttctcctcc ttgtataaat cctggttgct gtctctttat gaggagtgtg 180
 ggcccgttgt caggcaacgt ggcgtggtgt gcaactgtgtt tgctgacgca acccccactg 240
 gttggggcat tgccaccacc tgtcagctcc tttccgggac tttcgctttc cccctcccta 300
 ttgccacggc ggaactcatc gccgcctgcc ttgcccgctg ctggacaggg gctcggctgt 360
 tgggcactga caattccgtg gtgttgctcg ggaatcatc gtcctttcct tggctgctcg 420
 cctgtgttgc cacctggatt ctgcgcggga cgtccttctg ctacgtccct tcggccctca 480
 atccagcggga ccttccttcc cgcggcctgc tgccggctct gcggcctctt ccgctcttc 540
 gccttcgccc tcagacgagt cggatctccc tttgggccgc ctccccgc 588

<210> 6
 <211> 934
 <212> ADN
 <213> Gallus gallus

5

<400> 6

attgacgtca ataatgacgt atgttcccat agtaacgccca atagggactt tccattgacg 60
 tcaatgggtg gagtatttac ggtaaactgc ccacttgcca gtacatcaag tgtatcatat 120
 gccaagtacg cccctattg acgtcaatga cggtaaattgg cccgcctggc attatgcccc 180
 gtacatgacc ttatgggact ttctacttgg gcagtacatc tacgtattag tcatcgctat 240
 taccatggtc gaggtgagcc ccacgttctg cttcactctc cccatctccc cccctcccc 300
 accccaatt ttgtatttat ttatTTTTTA attatTTTgt gcagcgatgg gggcgggggg 360
 gggggggggg cgcgcgccag gcggggcggg gcggggcgag gggcggggcg gggcgaggcg 420
 gagaggtgcg gcggcagcca atcagagcgg cgcgctccga aagtttcctt ttatggcgag 480
 gcggcggcgg cggcggccct ataaaaagcg aagcgcgcgg cgggcgggag tcgctgcgcg 540
 ctgccttgcg cccgtgcccc gctccgcgcg cgcctcgcgc cgcgcccccc ggctctgact 600
 gaccgcggtta ctcccacagg tgagcggggc ggacggccct tctcctccgg gctgtaatta 660
 gcgcttggtt taatgacggc ttgtttcttt tctgtggctg cgtgaaagcc ttgaggggct 720
 ccgggagggc cctttgtgcg gggggagcgg ctcggggctg tccgcggggg gacggctgcc 780
 ttcggggggg acggggcagg gcggggttcg gcttctggcg tgtgaccggc ggctctagag 840
 cctctgctaa ccatgttcat gccttcttct ttttcttaca gctcctgggc aacgtgctgg 900
 ttattgtgct gtctcatcat tttggcaaag aatt 934

10

ES 2 676 550 T3

	<210> 7		
	<211> 270		
	<212> ADN		
	<213> Bos primigenius		
5	<400> 7		
	tcgctgatca gcctcgactg tgccttctag ttgccagcca tctgttgttt gcccctcccc	60	
	cgtgccttcc ttgacctgg aaggtgccac tccactgtc ctttcctaataaaaatgagga	120	
	aattgcatcg cattgtctga gtaggtgtca ttctattctg gggggtgggg tggggcagga	180	
	cagcaagggg gaggattggg aagacaatag caggcatgct ggggatgcgg tgggctctat	240	
	ggcttctgag gcggaaagaa ccagctgggg	270	
10	<210> 8		
	<211> 144		
	<212> ADN		
	<213> virus adenoasociado 2		
15	<400> 8		
	ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgctc ggcgaccttt	60	
	ggtcgcccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa ctccatcact	120	
	agggggttct tgtagttaat gatt	144	
20	<210> 9		
	<211> 145		
	<212> ADN		
	<213> virus adenoasociado 2		
25	<400> 9		
	tgcgcgctcg ctcgctcact gaggccgggc gaccaaaggt cgcccgcgc ccgggctttg	60	
	cccgggcggc ctcagtgagc gagcgagcgc gcagagcttt ttgcaaaagc ctaggcctcc	120	
	aaaaaagcct ctcactact tctgg	145	

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una partícula de vector de virus adenoasociado de serotipo 2 (AAV2) para su uso en el tratamiento o la prevención de coroideremia, en la que el genoma de la partícula es un genoma de AAV2 que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica REP1 como se representa en la SEQ ID NO: 3 o una variante de la misma que tiene al menos un 97 % de identidad sobre la longitud completa de la SEQ ID NO: 3, en la que dicha secuencia polinucleotídica que codifica REP1 está unida de forma funcional a una secuencia promotora.
- 10 2. Una partícula de vector AAV2 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el genoma es como se representa en la SEQ ID NO: 1 y/o carece de una o más del grupo de una secuencia de repetición terminal invertida (ITR), la secuencia génica de replicación (rep) y la secuencia génica de la cápsida (cap).
- 15 3. Una partícula de vector AAV2 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que dicha REP1 tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 3.
- 20 4. Una partícula de vector AAV2 para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que dicha secuencia polinucleotídica que codifica REP1 como se representa en la SEQ ID NO: 3 tiene al menos un 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 2 sobre su secuencia completa.
- 25 5. Una partícula de vector AAV2 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicho promotor es constitutivamente activo.
- 30 6. Una partícula de vector AAV2 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la expresión a partir de dicho promotor es específica de célula retiniana.
- 35 7. Una partícula de vector AAV2 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende una o más secuencias reguladoras adicionales.
8. Una partícula de vector AAV2 para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en la que dicho genoma comprende una secuencia que tiene al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 5 sobre su secuencia completa.
9. Una partícula de vector AAV para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la partícula de vector se administra por inyección directa retiniana, subretiniana o intravítrea.
10. Una partícula de vector AAV2 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicha partícula de vector se administra directamente al espacio subretiniano.

Figura 1

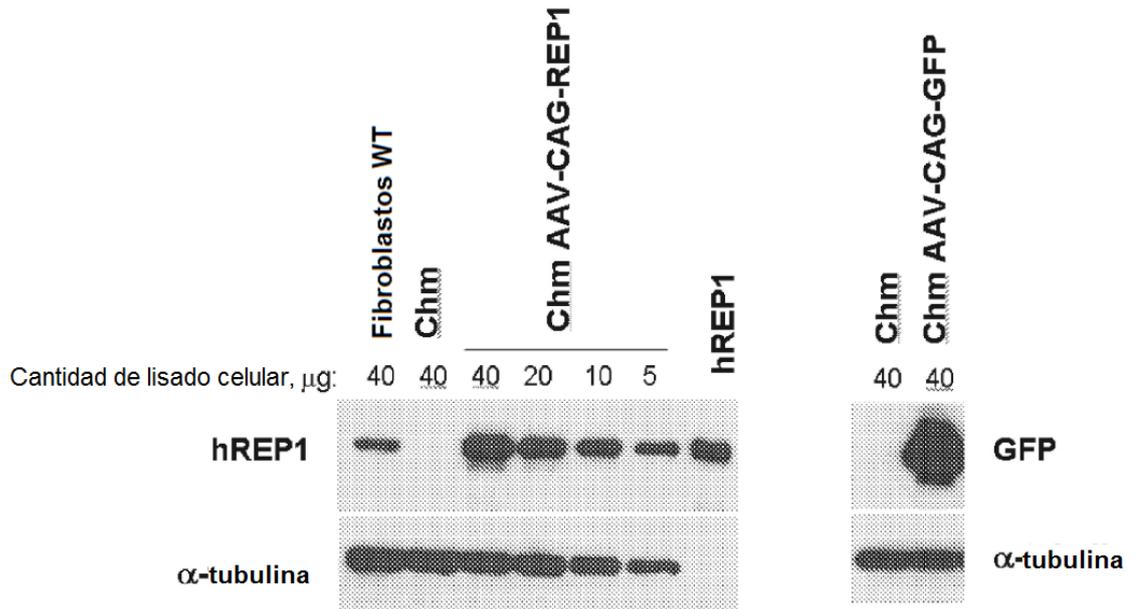


Figura 2

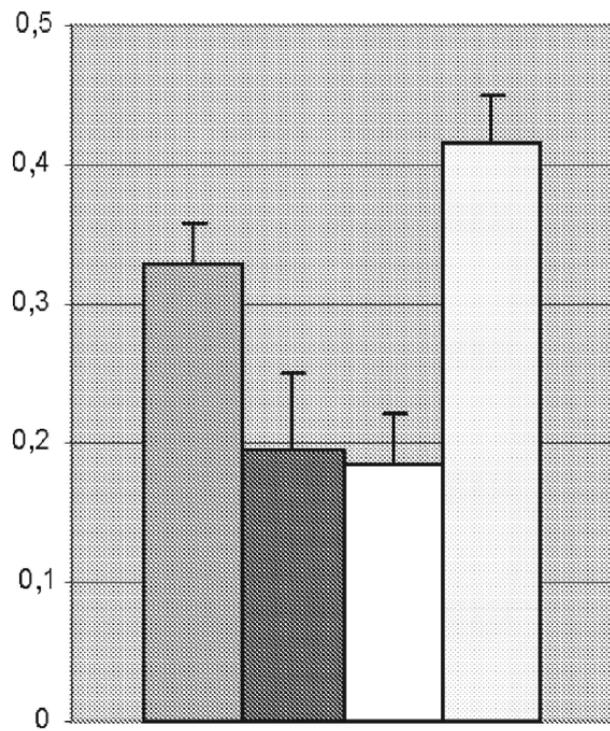


Figura 3

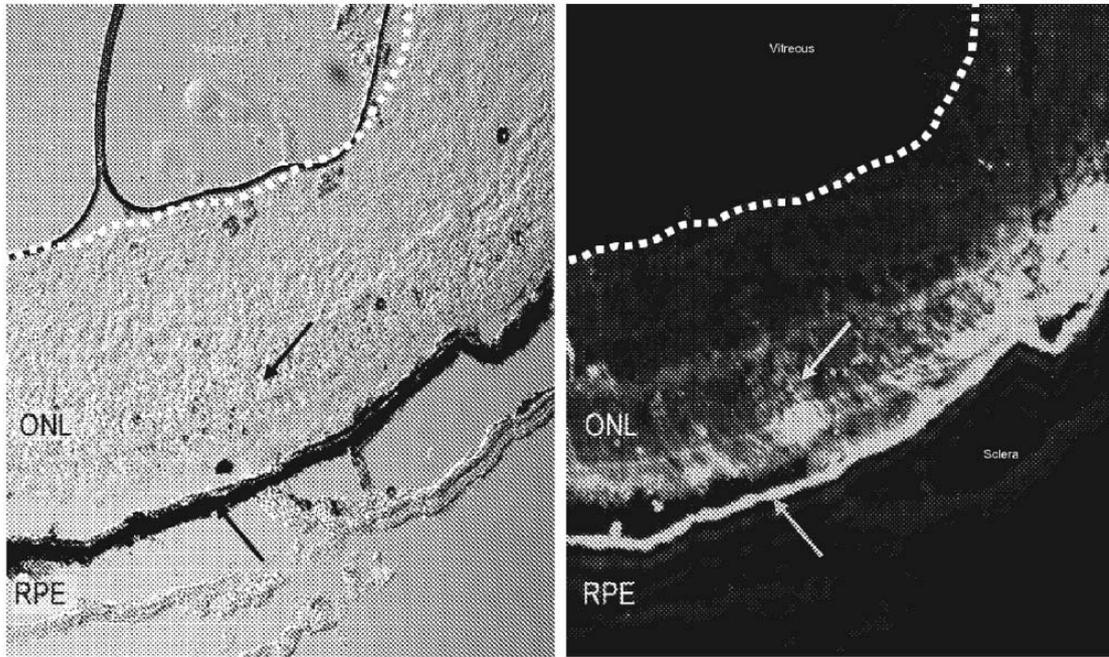


Figura 4

