

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 685 611**

51 Int. Cl.:

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.02.2012 PCT/US2012/025088**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.08.2012 WO12112578**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.02.2012 E 12746664 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.05.2018 EP 2675484**

54 Título: **Vector VAA8 mejorado con una actividad funcional aumentada y métodos de utilización del mismo**

30 Prioridad:
14.02.2011 US 201161442606 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.10.2018

73 Titular/es:
**THE CHILDREN'S HOSPITAL OF PHILADELPHIA
(100.0%)
3401 Civic Center Boulevard
Philadelphia, PA 19104, US**

72 Inventor/es:
**WRIGHT, JOHN, FRASER;
ZELENAIA, OLGA;
HAUCK, BERND;
MINGOZZI, FEDERICO y
HIGH, KATHERINE, A.**

74 Agente/Representante:
CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 685 611 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

Vector VAA8 mejorado con una actividad funcional aumentada y métodos de utilización del mismo.

5 **Campo de la invención**

La presente solicitud se refiere a los campos de la terapia génica y la biología molecular. Más específicamente, la presente invención proporciona unos vectores víricos adenoasociados que comprenden variantes de cápside proteica que aceleran la degradación y eliminación del vector, reduciendo de esta manera respuestas inmunológicas no deseables.

Antecedentes de la invención

La terapia génica presenta como objetivo tratar enfermedades tanto genéticas como infecciosas mediante la introducción de nuevo material genético en las células apropiadas en el cuerpo. Uno de los mayores retos de la terapia génica es la transferencia eficiente de material genético al interior de las células vivas. La utilización de vectores víricos recombinantes para la administración génica mejora significativamente este procedimiento. Dos vectores víricos utilizados comúnmente capaces de dirigir la transferencia génica in vivo se derivan de adenovirus (Ad) y virus adenoasociados (VAA). La mayoría de los 987 ensayos de terapia génica en todo el mundo han utilizado vectores víricos, 256 han utilizado vectores Ad (25,9%) y 25 han utilizado vectores VAA (2,5%).

Se ha desarrollado una diversidad de vectores de administración génica que pueden conseguir la administración de genes terapéuticos en las células de mamífero in vitro e in vivo. Algunos de estos son vectores víricos, los cuales están basados en virus comunes, por ejemplo el virus adenoasociado de tipo 2 (VAA2). Estructuralmente, VAA2 es un virus relativamente simple, es ubicuo en las poblaciones humanas y no es conocido que cause ninguna enfermedad. El VAA2 modificado genéticamente (recombinante) ha sido estudiado ampliamente como vector de administración génica con potencial de tratar eficazmente muchas enfermedades graves y crónicas en el ser humano. Más recientemente se han descrito serotipos adicionales de VAA (p.ej., VAA8) que han expandido todavía más la promesa de estos vectores para la transferencia génica terapéutica. Los estudios realizados utilizando varios modelos animales diferentes han demostrado que los vectores VAA pueden mediar en la transferencia y expresión de genes codificantes de proteínas terapéuticas, tales como los factores de coagulación sanguínea VIII (Scallan et al.) y IX (Herzog et al., 1999), Synder et al. (1999) y los anticuerpos monoclonales (Lewis et al., 2002) y algunas otras proteínas de potencial beneficio clínico terapéutico. Los ensayos clínicos humanos en los que se han administrado vectores VAA2 que expresan el factor de coagulación humano IX han confirmado su capacidad de administrar niveles terapéuticos de factor de coagulación humano IX (High et al., 2003; Manno et al., 2006). Sin embargo, la inmunidad preexistente frente al VAA2 y las respuestas inmunológicas adaptativas a los componentes no humanos (p.ej., las proteínas de cápside víricas) de los vectores de transferencia génica basados en VAA sigue siendo una barrera para conseguir una transferencia génica consistente y eficiente y la expresión a largo plazo de genes terapéuticos en el ser humano. Los estudios confirman que la rápida degradación y eliminación de la proteína de cápside de los VAA en las células transducidas resulta importante para conseguir una expresión transgénica terapéutica a largo plazo en el ser humano.

Yang et al (HGT, Vol. 9, 1998, páginas 1929 a 1937) dan a conocer que un fragmento de anticuerpo monocatenario que reconoce CD34 puede incorporarse en una partícula vector VAA2 en el caso de que se fusione con el extremo N-terminal de la proteína de cápside VP2 y se produzca en presencia de VP1, VP2 y VP3 de tipo salvaje.

Hauck et al. (Mol. Ther. Vol. 7, páginas 419 a 425, 2003) dan a conocer la producción de vectores VAA quiméricos que expresan hFIX, en los que cada virión empaquetado contiene las proteínas de cápside VP1, VP2 y VP3 procedentes de tanto VAA1 como VAA2.

Sumario de la invención

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un vector virus adenoasociado (VAA) que comprende una proteína de cápside alterada, en el que la proteína de cápside alterada reduce la integridad y rigidez de dicho virus, facilitando de esta manera la eliminación del virus después de la transducción de un transgén terapéutico.

En una forma de realización, se proporciona un vector virus adenoasociado (VAA) que presenta un serotipo de VAA1, VAA6, VAA8 o VAA9, que comprende:

- (i) una cápside que comprende una proteína VP1.5 de VAA1, VAA6, VAA8 o VAA9, respectivamente,
- (ii) un minigén que comprende repeticiones terminales invertidas de VAA, y

(iii) una secuencia de ácidos nucleicos heteróloga ligada operablemente a secuencias reguladoras que dirigen la expresión de un producto a partir de la secuencia de ácidos nucleicos heteróloga en una célula hospedadora, en la que

- 5 (a) dicho vector de VAA es un VAA8 y dicha proteína VP1.5 consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 5, panel A, en la que el aminoácido en el extremo aminoterminal es una leucina o en la que dicha proteína VP1.5 consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 5, panel B, en la que el aminoácido en el extremo aminoterminal es una metionina, o
- 10 (b) el vector de VAA se selecciona del grupo que consiste en VAA1, VAA6 y VAA9, y comprende un codón CTG variante en lugar de un CTC natural en la posición 219 de la secuencia de nucleótidos codificante de la proteína cap, o
- 15 (c) dicho vector de VAA es un vector VAA8 y comprende un codón de inicio CTG variante en la posición 177 de la secuencia de nucleótidos codificante de la proteína cap.

El vector de VAA puede comprender además las proteínas de cápside VP1, VP2 y VP3 o el vector de VAA puede no presentar VP1. El vector de VAA puede ser VAA8.

20 En una forma de realización preferente, los vectores VAA de la invención que comprenden las proteínas de cápside variantes resultan útiles para la expresión de péptidos terapéuticos. Entre dichos péptidos se incluyen, aunque sin limitación, una molécula de ARNi antivírica, factor VIII, factor IX o un fragmento funcional de los mismos. Entre los productos de expresión adicionales se incluyen, por ejemplo, IgG, IgM, IgA, IgD, IgE, inmunoglobulinas quiméricas, anticuerpos humanizados o anticuerpos monocatenarios. En un aspecto, el

25 producto de expresión es un ARNi que resulta útil para inhibir la infección y replicación del VHC.

En otra forma de realización de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende el vector de VAA de la invención en un portador biológicamente compatible. También se encuentran comprendidos en la presente invención cultivos celulares que comprende los vectores dados a conocer en la presente memoria.

30 La invención comprende además el vector de VAA de la invención para la utilización en un método de administración de un transgén en una célula en un sujeto, en el que dicho método comprende la etapa de poner en contacto la célula con el vector de VAA tal como se da a conocer en la presente memoria, en el que dicho vector de VAA comprende el transgén, en el que la presencia de vp1.5 en dicho vector está asociada a una

35 respuesta de IgG anticápside reducida.

Breve descripción de los dibujos

40 Figura 1. Gel de SDS-PAGE teñido con plata representativo que muestra VP1.5, una banda de VP de VAA en una posición intermedia entre las bandas canónicas VP1 y VP2.

45 Figura 2. Alineación de secuencias que muestra la secuencia de nucleótidos canónica para VAA8 (VAA8-cap) comparada con la secuencia observada para pVAA8PK SeqWright Ju108 (VAA8.1). En dicha alineación, la base C en la posición 219 de la secuencia de nucleótidos de cap de VAA8 informada (correspondiente a la posición 2.339 en la secuencia genómica de VAA8 informada en la fig. 1B en la patente US nº 7.790.449 (Gao et al., y en GeneBank nº AF513852.1) del codón CTC, ha sido modificada por la base G, resultando en un codón dentro del marco CTG, que es conocido que actúa como un codón de parada alternativo (Claus et al., 2003). Ambos estos codones codifican el aminoácido leucina (L), situado en la secuencia NAADAAALEHDKAYD, correspondiente a la posición aminoácida 72 de VAA8 VP1 tal como se informa en la

50 fig. 2A en la patente US nº 7.790.449 (Gao et al.). El codón CTG aparentemente actúa como un codón de inicio inesperado en las células de mamífero utilizado para generar vectores VAA.

55 Figura 3. Micrografías electrónicas de partículas VAA purificadas con tinción negativa. (A) muestra los vectores VAA8 normales (control de VAA8); (B) muestra unos vectores VAA2 normales (control de VAA2) y (C) muestra unos vectores VAA8 variantes (VAA8.1) que contienen la proteína de cápside VP1.5. Los vectores VAA8.1 que contiene la cápside VP1.5 son menos simétricos que los vectores VAA de control que no presentan dicha mutación y muestran evidencia de fragmentación de la partícula vector, confirmando que presentan una arquitectura de la cápside menos estable.

60 Figura 4. Evaluación de la capacidad de los vectores VAA8 codificantes del factor de coagulación humano IX (hF.IX) de transducir y expresar hF.IX circulante tras la administración en ratones. (A) Muestras el nivel de hF.IX circulante determinado mediante ELISA, 2, 4 y 6 semanas después de la administración del vector VAA8-hFIX Lote KA434 (control) y del vector VAA-hFIX Lote KA535 (nuevo vector VAA8.1 que contiene las proteínas de cápside VP1.5).

65

La figura 5 muestra la secuencia de aminoácidos de VP1.5. El panel A muestra la secuencia predicha bajo la

premisa de que el codón variante CTG codifica el aminoácido leucina. El panel B muestra la secuencia de aminoácidos predicha bajo la premisa de que el codón variante CTG codifica el aminoácido metionina, predicho debido a que es el primer aminoácido en el polipéptido variante.

5 La figura 6 muestra la alineación de secuencias de VAA1, VAA6, VAA8 y VAA9. Tal como se muestra en las regiones en cajas, el codón CTC indicado en la figura 2 está conservado en cada uno de dichos serotipos de VAA. Se predice que dichos otros serotipos pueden alterarse mediante sustitución de C en la posición 219 por G, mediante mutagénesis dirigida a sitio de la secuencia de nucleótidos. Se predice que dicho cambio genere cápside que contienen una banda de VP adicional en estos otros serotipos, correspondiente a VP1.5 descrito para VAA8.1, resultando en una nueva estructura alterada y en una rigidez reducida, y que se predice que facilita la transducción y la expresión a largo plazo de los transgenes en estos otros serotipos.

15 La figura 7 muestra la localización de otro codón CTC en la secuencia de nucleótidos de cap del VAA8 (dentro de la caja). El cambio del nucleótido C en la posición 177 por una G en VAA8 se predice que introducirá un codón de inicio, resultando en una nueva composición de cápside modificada. El cambio del nucleótido C en la posición 177 por una G en VAA8.1 se predice que introducirá un codón de inicio, resultando en otra nueva composición de cápside modificada que comprende cinco polipéptidos de cápside que resulta ventajosa en las aplicaciones de terapia génica.

20 Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona una nueva y mejorada composición de vector de VAA para la utilización en protocolos de terapia génica. Se han iniciado ensayos clínicos humanos en los que se administran vectores VAA8 que expresan el factor de coagulación humano IX, que informan de resultados preliminares prometedores (Nathwani et al., 2010). Basándose en estudios clínicos anteriores con VAA2 (Manno et al., 2006), la degradación de las proteínas de cápside de VAA que no era suficientemente rápida para eliminar las proteínas de cápside antes de que los efectores inmunológicos celulares reconociesen y eliminasen las células transducidas podría haber contribuido al fracaso en la consecución de una expresión transgénica a largo plazo en el ser humano. En la presente invención, un único intercambio de nucleótido en el gen codificante de cap de VAA8 se ha encontrado que resulta en un codón de inicio adicional (CTG). Los presentes inventores se refieren a dicho vector VAA8 variante como VAA8.1. La distribución de VP canónica en los vectores VAA es VP1, VP2 y VP3: tres variantes N-terminales que resultan de sitios de inicio diferentes durante la transcripción de cap de VAA. Cada partícula de VAA está constituida de aproximadamente 60 proteínas VP en total, que comprenden VP1, VP2 y VP3 (tres especies de polipéptido) en las proporciones aproximadas de proteínas siguientes: 5 VP1 + 5 VP2 + 50 VP3. En el caso de VAA8.1, el cambio de un único nucleótido aparentemente proporciona una proteína VP adicional, de longitud intermedia entre VP1 y VP2. En la presente memoria, la proteína VP variante aparentemente exclusiva de VAA8.1 se denomina VP1.5. El nuevo polipéptido VP1.5 se encuentra presente en VAA8.1 en cantidades comparables a VP1 y VP2. Aparentemente la inclusión de dicha proteína VP variante en la estructura de cápside no altera la actividad funcional medida por la transducción in vivo en ratones, aunque aparentemente altera ligeramente la integridad y/o reduce la rigidez de la cápside, lo que debería resultar en un desensamblaje y eliminación acelerados del virus después de la transducción del transgén. La eliminación acelerada debería, a su vez, reducir o eliminar las funciones efectoras inmunológicas deletéreas tras la administración clínica del vector. La integridad alterada / rigidez reducida de VAA8.1 también debería facilitar un empaquetamiento mejorado del ADN terapéutico que excede el límite de empaquetamiento normal (aproximadamente 4,7 kb) de los vectores VAA8.

I. Definiciones:

50 La "terapia génica" es la inserción de genes en las células y/o tejidos de un individuo para tratar una enfermedad, comúnmente enfermedades hereditarias en las que un alelo mutante defectuoso se sustituye o complementa con uno funcional.

Los "virus adenoasociados", de la familia de los parvovirus, son virus pequeños con un genoma de ADN monocatenario. Estos virus pueden insertar material genético en un sitio específico en el cromosoma 19 y resultan preferentes porque no están asociados a ninguna enfermedad patológica en el ser humano.

Una "proteína humana" para la utilización en los vectores de la invención preferentemente es una proteína altamente conservada que no sería reconocida como antígeno foráneo o no propio por el sistema inmunológico humano. Aunque en la presente memoria se ejemplifica la albúmina sérica humana, entre otras proteínas que resultarían útiles con este fin se incluyen, aunque sin limitación, el fibrinógeno A, el fibrinógeno B, la beta-2-microglobulina, la glucoproteína cinc-alfa-2, la glucoproteína alfa-2-HS (fetuína), la proteína amiloide sérica A, la haptoglobina, la profilina, la desmocolina, las timosinas beta-4 y beta-10, la apolipoproteína C-III, la uteroglobina, la ubiquitina, la gelsolina, el colágeno, la fibrina, así como fragmentos de éstas y otras proteínas humanas.

65 Un péptido o proteína "terapéutico" es un péptido o proteína que puede aliviar o reducir los síntomas que resultan de una ausencia o defecto en una proteína en una célula o sujeto. Alternativamente, un péptido o proteína

"terapéutico" es una que de otra manera proporciona un beneficio a un sujeto, p. ej., efectos anticáncer. Entre los péptidos y proteínas terapéuticos se incluyen, aunque sin limitación, CFTR (proteína reguladora transmembranaria de la fibrosis quística), distrofina (incluyendo el producto proteína de minigenes de distrofina; ver, p.ej., Vincent et al., *Nature Genetics* 5:130, 1993), utrofina (Tinsley et al., *Nature* 384:349, 1996), factores de coagulación (factor XIII, factor IX, factor X, etc.), anticuerpos monoclonales (Lewis et al., 2002), eritropoyetina, el receptor de LDL, lipoproteína lipasa, ornitina transcarbamilasa, β -globina, α -globina, espectrina, α -antitripsina, adenosina desaminasa, hipoxantina guanina fosforibosil transferasa, β -glucocerebrosidasa, esfingomielinasa, hexosaminidasa lisosómica, cetoácido deshidrogenasa de cadena ramificada, hormonas, factores de crecimiento (p.ej., factores de crecimiento 1 y 2 similares a la insulina, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento nervioso, factores neurotróficos 3 y 4, factor neurotrófico derivado del cerebro, factor de crecimiento derivado de células gliales, factores α y β de crecimiento transformante y similares), citoquinas (p.ej., α -interferón, β -interferón, interferón- γ , interleuquina-2, interleuquina-4, interleuquina-12, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos, linfotóxina), productos de gen suicida (p.ej., virus herpes simplex, timidina quinasa, citosina desaminasa, toxina diftérica, citocromo P450, desoxicitidina quinasa y factor de necrosis tumoral), proteínas que confieren resistencia a un fármaco utilizados en la terapia del cáncer, productos génicos supresores tumorales (p.ej., p53, Rb, Wt-1, NF1, VHL, AC y similares) y cualquier otro péptido o proteína que presente un efecto terapéutico en un sujeto que lo necesita.

Entre los péptidos o proteínas terapéuticos ejemplares adicionales se incluyen los que pueden utilizarse en el tratamiento de una condición patológica, incluyendo, aunque sin limitación, la fibrosis quística (y otras enfermedades del pulmón), hemofilia A, hemofilia B, talasemia, anemia y otros trastornos sanguíneos, SIDA, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, epilepsia y otros trastornos neurológicos, cáncer, diabetes mellitus, distrofias musculares (p.ej., Duchenne, Becker), enfermedad de Gaucher, enfermedad de Hurler, deficiencia en adenosina desaminasa, enfermedad del almacenamiento del glucógeno y otros defectos metabólicos, enfermedades degenerativas retinianas (y otras enfermedades oculares) y enfermedades de órganos sólidos (p.ej., cerebro, hígado, riñón y corazón).

El término "promotores" o "promotor" tal como se utiliza en la presente memoria puede referirse a una secuencia de ADN que está situada contigua a una secuencia de ADN que codifica un producto recombinante. Un promotor preferentemente está operablemente ligado a una secuencia de ADN contigua. Un promotor típicamente incrementa la cantidad de producto recombinante expresada a partir de una secuencia de ADN en comparación con la cantidad del producto recombinante expresada en caso de no existir un promotor. Puede utilizarse un promotor de un organismo para potenciar la expresión de productos recombinantes a partir de una secuencia de ADN que se origina a partir de otro organismo. Por ejemplo, puede utilizarse un promotor de vertebrado para la expresión de GFP de medusa en vertebrados. Además, un elemento promotor puede incrementar la cantidad de productos recombinantes expresada para múltiples secuencias de ADN unidas en tándem. Por lo tanto, un elemento promotor puede potenciar la expresión de uno o más productos recombinantes. Múltiples elementos promotores son bien conocidos por el experto ordinario en la materia.

En una forma de realización, se desea un nivel elevado de expresión constitutiva. Entre los ejemplos de dichos promotores se incluyen, aunque sin limitación, el virus del sarcoma de Rous retrovírico (VSR), el promotor/intensificador de RTL, el citomegalovirus (CMV), el promotor /intensificador temprano inmediato (ver, p.ej., Boshart et al., *Cell* 41:521-530, 1985), el promotor del SV40, el promotor dihidrofolato reductasa, el promotor β -actina citoplasmático y el promotor fosfoglicerol quinasa (PGK).

En otra forma de realización, pueden desearse promotores inducibles. Los promotores inducibles son aquellos que están regulados por compuestos suministrados exógenamente, en cis o en trans, incluyendo sin limitación, el promotor metalotionina (MT) de oveja inducible por cinc, el virus del tumor mamario de ratón (MMTV) inducible por dexametasona (Dex), el sistema promotor de polimerasa de T7 (documento n° WO 98/10088), el sistema reprimible por tetraciclina (Gossen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:5547-5551, 1992); el sistema inducible por tetraciclina (Gossen et al., *Science* 268:1766-1769, 1995); ver también Harvey et al., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2:512-518, 1998); el sistema inducible por RU486 (Wang et al., *Nat. Biotech.* 15:239-243, 1997) y Wang et al., *Gene Ther.* 4:432-441, 1997) y el sistema inducible por rapamicina (Magari et al., *J. Clin. Invest.* 100:2865-2872, 1997); Rivera et al., *Nat. Medicine* 2:1028-1032, 1996). Otros tipos de promotor inducible que pueden resultar útiles en el presente contexto son los que están regulados por un estado fisiológico específico, p.ej. la temperatura, una fase aguda o en células replicantes únicamente.

En otra forma de realización, se utiliza el promotor nativo para el transgén o secuencia de ácidos nucleicos de interés. El promotor nativo puede resultar preferente en el caso de que se desee que la expresión del transgén o de la secuencia de ácidos nucleicos imite la expresión nativa. El promotor nativo puede utilizarse en el caso de que la expresión del transgén u otra secuencia de ácidos nucleicos deba regularse temporalmente o durante el desarrollo, o de una manera específica de un tejido, o en respuesta a estímulos transcripcionales específicos. En una forma de realización adicional, otros elementos de control de la expresión nativos, tales como elementos intensificadores, sitios de poliadenilación o secuencias de consenso de Kozak también pueden utilizarse para imitar la expresión nativa.

En una forma de realización, el genoma vírico recombinante comprende un transgén operablemente ligado a un promotor específico de un tejido. Por ejemplo, en el caso de que se desee la expresión en músculo esquelético, puede utilizarse un promotor activo en el músculo. Entre ellos se incluyen los promotores de genes que codifican la α -actina esquelética, la miosina cadena ligera 2A, distrofina, creatina quinasa muscular, así como promotores musculares sintéticos con actividades más elevadas que los promotores de origen natural. Ver Li et al., Nat. Biotech. 17:241-245, 1999. Se conocen ejemplos de promotores que son específicos de tejido para la albúmina hepática (Miyatake et al., J. Virol. 71:5124-32, 1997); el promotor nuclear del virus de la hepatitis B (Sandig et al., Gene Ther. 3:1002-9, 1996); la alfa-fetoproteína (AFP) (Arbuthnot et al., Hum. Gene Ther. 7:1503-14, 1996), hueso (osteocalcina, Stein et al., Mol. Biol. Rep. 24:185-96, 1997); la sialoproteína ósea, Chen et al., J. Bone Miner. Res. 11 :654-64, 1996), linfocitos (CD2, Hansal et al., J. Immunol. 161:1063-8, 1998); cadena pesada de inmunoglobulina, cadena α de receptor de células T), promotor neuronal (enolasa específica neuronal (NSE) (Andersen et al., Cell. Mol. Neurobiol. 13:503-15, 1993); gen de cadena ligera de neurofilamento (Piccioli et al., Proc., Natl. Acad. Sci. USA 88:5611-5, 1991), el gen vgf específico neuronal (Piccioli et al., Neuron 15:373-84, 1995), entre otros.

El término "intensificadores" o "intensificador" tal como se utiliza en la presente memoria puede referirse a una secuencia de ADN que está situada contiguamente a una secuencia de ADN que codifica un producto recombinante. Los elementos intensificadores típicamente se localizan cadena arriba de un elemento promotor o pueden localizarse cadena abajo o dentro de una secuencia de ADN codificante (p.ej., una secuencia de ADN transcrita o traducida en un producto o productos recombinantes). Por lo tanto, un elemento intensificador puede estar localizado 100 pares de bases, 200 pares de bases o 300 o más pares de bases cadena arriba o cadena abajo de una secuencia de ADN que codifica un producto recombinante. Los elementos intensificadores pueden incrementar la cantidad de producto recombinante expresado a partir de una secuencia de ADN a un nivel superior a la expresión proporcionada por un elemento promotor. Múltiples elementos intensificadores se encuentran fácilmente disponibles para el experto ordinario en la materia.

La expresión "ácido nucleico" o "molécula de ácidos nucleicos" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a cualquier molécula de ADN o ARN, monocatenario o bicatenario, y, en el caso de ser monocatenario, la molécula de su secuencia complementaria en forma lineal o circular. Al discutir las moléculas de ácidos nucleicos, una secuencia o estructura de una molécula particular de ácidos nucleicos puede describirse en la presente memoria según la convención normal de proporcionar la secuencia en la dirección 5' a 3'. En referencia a los ácidos nucleicos de la invención, en ocasiones se utiliza la expresión "ácido nucleico aislado". Esta expresión, aplicada a ADN, se refiere a una molécula de ADN que está separada de secuencias que son inmediatamente contiguas en el genoma natural del organismo del que se origina. Por ejemplo, un "ácido nucleico aislado" puede comprender una molécula de ADN insertada en un vector, tal como un vector plásmido o virus, o integrarse en el ADN genómico de una célula u organismo huésped procariontario o eucariótico.

Un "vector" es un replicón, tal como un plásmido, cósmido, báculo, fago o virus, al que puede unirse otra secuencia o elemento genético (ADN o ARN) de manera que produzca la replicación de la secuencia o elemento unido.

Un "operón de expresión" se refiere a un segmento de ácidos nucleicos que puede poseer secuencias de control transcripcional o traduccional, tales como promotores, intensificadores, señales de inicio traduccional (p.ej., codones ATG o AUG), señales de poliadenilación, terminadores y similares, y que facilita la expresión de una secuencia codificante de polipéptido en una célula hospedadora u organismo.

Los términos "transformar", "transfectar" y "transducir" se refieren a cualquier método o medio por el que se introduce un ácido nucleico en una célula u organismo huésped y pueden utilizarse intercambiabilmente para transmitir el mismo significado. Entre dichos métodos se incluye, aunque sin limitación, la transfección, la electroporación, la microinyección, la inyección, la fusión de PEG y similares.

El ácido nucleico introducido puede o no integrarse (unirse covalentemente) a un ácido nucleico de la célula u organismo receptor. En las células bacterianas, de levadura, vegetales y de mamífero, por ejemplo, el ácido nucleico introducido puede mantenerse en forma de un elemento episómico o replicón independiente, tal como un plásmido. Alternativamente, el ácido nucleico introducido puede integrarse en el ácido nucleico de la célula u organismo receptor y mantenerse establemente en dicha célula u organismo y además pasarse o heredarse a las células u organismos de progenie de la célula u organismo receptor. Finalmente, el ácido nucleico introducido puede existir en la célula u organismo huésped receptor sólo transitoriamente.

La expresión "gen marcador seleccionable" se refiere a un gen que al expresarse confiere un fenotipo seleccionable, tal como resistencia a antibióticos, a una célula o planta transformada.

La expresión "ligado funcionalmente" se refiere a que las secuencias reguladoras necesarias para la expresión de la secuencia codificante en la molécula de ADN se introducen en las posiciones apropiadas respecto a la secuencia codificante de manera que produzcan la expresión de la secuencia codificante. Esta misma definición en ocasiones se aplica a la organización de las unidades de transcripción y otros elementos de control de la

transcripción (p.ej., intensificadores) en un vector de expresión.

El término "oligonucleótido" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a secuencias, cebadores y sondas de la presente invención y se define como molécula de ácidos nucleicos que comprende dos o más ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos, preferentemente más de tres. El tamaño exacto del oligonucleótido dependerá de diversos factores y en particular de la aplicación y utilización del oligonucleótido.

La expresión "hibridarse específicamente" se refiere a la asociación entre dos moléculas de ácidos nucleicos monocatenarias de secuencias suficientemente complementarias para permitir dicha hibridación bajo condiciones predeterminadas utilizadas generalmente en la técnica (en ocasiones denominadas "sustancialmente complementarias"). En particular, la expresión se refiere a la hibridación de un oligonucleótido con una secuencia sustancialmente complementaria contenida dentro de una molécula de ADN o ARN monocatenaria de la invención, excluyendo sustancialmente la hibridación de los oligonucleótidos con ácidos nucleicos monocatenarios de secuencia no complementaria.

El término "cebador" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un oligonucleótido de ADN, monocatenario o bicatenario, derivado de un sistema biológico, generado mediante digestión con enzima de restricción o producido sintéticamente, que, al encontrarse en el medio apropiado, es capaz de actuar funcionalmente como iniciador de la síntesis de ácidos nucleicos dependiente del molde. Al presentarse con un molde de ácidos nucleicos apropiado, los precursores nucleósido trifosfato adecuados de ácidos nucleicos, un enzima polimerasa, cofactores y condiciones adecuados, tales como una temperatura y pH adecuados, el cebador puede extenderse desde su extremo 3'-terminal mediante la adición de nucleótidos por la acción de una polimerasa o actividad similar, rindiendo un producto de extensión del cebador. El cebador puede variar en longitud dependiendo de las condiciones particulares y requisitos de la aplicación. Por ejemplo, en aplicaciones diagnósticas, el cebador oligonucleótido típicamente presenta una longitud de 15 a 25 o más nucleótidos. El cebador debe presentar suficiente complementariedad con el molde deseado para cebar la síntesis del producto de extensión deseado, es decir, ser capaz de hibridarse con la cadena molde deseada de una manera suficiente para proporcionar la fracción 3'-hidroxilo del cebador en yuxtaposición apropiada para la utilización en el inicio de la síntesis por parte de una polimerasa o enzima similar. No resulta necesario que la secuencia de cebador representa un complemento exacto del molde deseado. Por ejemplo, una secuencia de nucleótidos no complementaria puede unirse al extremo 5' de un cebador de otro modo complementario. Alternativamente, pueden intercalarse bases no complementarias dentro de la secuencia del cebador oligonucleótido, con la condición de que la secuencia del cebador presente suficiente complementariedad respecto a la secuencia de la cadena molde deseada para proporcionar funcionalmente un complejo molde-cebador para la síntesis del producto de extensión.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha sido descrita en las patentes US nº 4.683.195, nº 4.800.195 y nº 4.965.188.

El término "aislado" puede referirse a un compuesto o complejo que ha sido suficientemente separado de otros compuestos con los que se encontraría asociado naturalmente. El término "aislado" no pretende excluir mezclas artificiales o sintéticas con otros compuestos o materiales, o la presencia de impurezas que no interfieren con la actividad fundamental o ensayos posteriores, y que pueden encontrarse presentes, por ejemplo, debido a una purificación incompleta o la adición de estabilizadores.

La expresión "reacción inmunitaria" pretende referirse a cualquier respuesta a un antígeno o determinante antigénico por el sistema inmunológico de un sujeto vertebrado. Entre las respuestas inmunitarias ejemplificativas se incluyen las respuestas inmunológicas humorales (p.ej., la producción de anticuerpos específicos de antígeno) y las respuestas inmunológicas mediadas por células (p.ej., la proliferación de linfocitos), tal como se define a continuación en la presente memoria.

II. Métodos de utilización y métodos de administración de los vectores víricos adenoasociados variantes de la invención

Los métodos descritos en la presente memoria proporcionan un medio para administrar secuencias de ácidos nucleicos heterólogas en un amplio abanico de células hospedadoras, incluyendo células en división y células que no se dividen. Los vectores y otros reactivos, métodos y formulaciones farmacéuticas dadas a conocer en la presente memoria resultan adicionalmente útiles para la utilización en un método de administración de una proteína o péptido en un sujeto que lo necesita, para el tratamiento u otros. De esta manera, la proteína o péptido puede producirse de esta manera in vivo en el sujeto. El sujeto puede necesitar la proteína o péptido debido a que presenta una deficiencia de la proteína o péptido, o debido a que la producción de la proteína o péptido en el sujeto puede proporcionar algún efecto terapéutico, como tratamiento u otro, y tal como se explica en mayor detalle posteriormente.

En general, la presente invención puede utilizarse para administrar cualquier ácido nucleico foráneo con un efecto biológico con el fin de tratar o mejorar los síntomas asociados a cualquier trastorno relacionado con la

expresión génica. Entre los estados patológicos ilustrativos se incluyen, aunque sin limitación, fibrosis quística (y otras enfermedades del pulmón), hemofilia A, hemofilia B, talasemia, anemia y otros trastornos de la coagulación sanguínea, SIDA, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, epilepsia y otros trastornos neurológicos, cáncer, diabetes mellitus, distrofias musculares (p.ej., Duchenne, Becker), enfermedad de Gaucher, enfermedad de Hurler, deficiencia en adenosina desaminasa, enfermedades del almacenamiento del glucógeno y otros defectos metabólicos, enfermedades degenerativas retinianas (y otras enfermedades oculares), enfermedades de órganos sólidos (p.ej., del cerebro, hígado, riñón o corazón) y similares.

Además, la presente invención puede utilizarse para administrar ácidos nucleicos codificantes de anticuerpos monoclonales o fragmentos de los mismos que es conocido que proporcionan efectos biológicos para tratar o mejorar los síntomas asociados a cánceres, enfermedades infecciosas y enfermedades autoinmunitarias, tales como la artritis reumatoide.

La transferencia génica presenta sustancialmente un uso potencial en la comprensión y provisión de terapia para estados de enfermedad. Existen varias enfermedades hereditarias en las que se conocen genes defectuosos y que han sido clonados. En algunos casos, es conocida la función de dichos genes clonados. En general, los estados de enfermedad anteriormente indicados se clasifican en dos grupos: estados de deficiencia, habitualmente de enzimas, que generalmente son hereditarios de modo recesivo, y estados de desequilibrio, que por lo menos en ocasiones implican proteínas reguladoras o estructurales, que son hereditarios de modo dominante. Para las enfermedades de estado de deficiencia, la transferencia génica podría utilizarse para llevar un gen normal a los tejidos afectados para la terapia de sustitución, así como para crear modelos animales para la enfermedad utilizando mutaciones antisentido. Para los estados de enfermedad de desequilibrio, la transferencia génica podría utilizarse para crear un estado de enfermedad en un sistema modelo que seguidamente podría utilizarse en los esfuerzos para contrarrestar el estado de enfermedad. De esta manera, los métodos dados a conocer en la presente memoria permiten el tratamiento de enfermedades genéticas. Tal como se utiliza en la presente memoria, un estado de enfermedad se tratar remediando parcial o completamente la deficiencia o desequilibrio que causa la enfermedad o que la hace más severa. La utilización de la integración específica de sitio de secuencias de ácidos nucleicos para causar mutaciones o para corregir defectos también resulta posible.

Finalmente, la presente invención encuentra utilidad adicional en los métodos diagnósticos y de cribado, en los que un gen de interés se expresa transitoria o establemente en un sistema de cultivo celular, o alternativamente, en un modelo de animal transgénico.

III. Sujetos, formulaciones farmacéuticas, vacunas y modos de administración

La presente invención encuentra utilidad en aplicaciones tanto veterinarias como médicas. Entre los sujetos adecuados se incluyen aves y mamíferos, siendo preferentes los mamíferos. El término "aviar" tal como se utiliza en la presente memoria incluye, aunque sin limitación, pollos, patos, gansos, codornices, pavos y faisanes. El término "mamífero" tal como se utiliza en la presente memoria incluye, aunque sin limitación, seres humanos, bovinos, ovinos, caprinos, equinos, felinos, caninos, lagomorfos, etc. Los sujetos humanos son los más preferentes. Entre los sujetos humanos se incluyen sujetos fetales, neonatales, infantiles, juveniles y adultos.

En formas de realización particulares, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una partícula vírica de la invención en un portador farmacéuticamente aceptable u otros agentes medicinales, agentes farmacéuticos, portadores, adyuvantes, diluyentes, etc. Para la inyección, el portador típicamente es un líquido. Para otros métodos de administración, el portador puede ser sólido o líquido, tal como agua estéril libre de pirógenos o solución salina tamponada con fosfato estéril libre de pirógenos. Para la administración por inhalación, el portador es respirable y preferentemente se encuentra en forma de partículas sólida o líquida. Como medio de inyección, resulta preferente utilizar agua que contiene los aditivos habituales para las soluciones para inyección, tales como agentes estabilizadores, sales o solución salina y/o tampones.

En otras formas de realización, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una célula en la que se ha integrado un provirus VAA en el genoma en un portador farmacéuticamente aceptable u otros agentes medicinales, agentes farmacéuticos, portadores, adyuvantes, diluyentes, etc.

La expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a un material que no resulta indeseable biológicamente o de otro modo, p.ej., el material puede administrarse en un sujeto sin causar ningún efecto biológico no deseable. De esta manera, puede utilizarse dicha composición farmacéutica, por ejemplo en la transfección de una célula ex vivo o en la administración de una partícula vírica o célula directamente en un sujeto.

La presente exposición proporciona además un método in vitro de administración de un ácido nucleico en una célula. Para los métodos in vitro, el virus puede administrarse en la célula mediante métodos estándares de transducción vírica, tal como son conocidos de la técnica. Preferentemente, las partículas víricas se añaden a las células a la multiplicidad de infección apropiada según métodos de transducción estándares apropiados para las

células diana particulares. Los títulos de virus para la administración pueden variar, dependiendo del tipo celular diana y del vector vírico particular, y el experto en la materia los podrá determinar sin necesidad de experimentación indebida. Alternativamente, la administración de un vector parvovirus de la presente invención puede llevarse a cabo mediante cualesquiera otros medios conocidos de la técnica.

5 Los vectores víricos recombinantes se administran preferentemente en la célula en una cantidad biológicamente eficaz. Una cantidad "biológicamente eficaz" del vector vírico es una cantidad que resulta suficiente para resultar en la infección (o transducción) y la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos heteróloga en la célula. En el caso de que el virus se administre en una célula in vivo (p.ej., el virus se administra en un sujeto tal como se indica posteriormente), una cantidad "biológicamente eficaz" del vector vírico es una cantidad que resulta suficiente para resultar en la transducción y expresión de la secuencia de ácidos nucleicos heteróloga en una célula diana.

15 La célula en la que debe administrarse el vector vírico inventivo puede ser de cualquier tipo, incluyendo, aunque sin limitación, células neurales (incluyendo células de los sistemas nerviosos periférico y central, en particular, células cerebrales), células pulmonares, células retinianas, células epiteliales (p.ej., células epiteliales intestinales y respiratorias), células musculares, células pancreáticas (incluyendo células de los islotes), células hepáticas, células miocárdicas, células óseas (p.ej., células madre de la médula ósea), células madre hematopoyéticas, células de bazo, queratinocitos, fibroblastos, células endoteliales, células de próstata, células germinales y similares. Alternativamente, la célula puede ser cualquier célula progenitora. Como alternativa adicional, la célula puede ser una célula madre (p.ej., una célula madre neural o una célula madre hepática). Además, las células pueden ser de cualquier especie de origen, tal como se ha indicado anteriormente.

25 En casos particulares, las células se extraen de un sujeto, se introduce el vector parvovirus dentro de las mismas y seguidamente las células se reintroducen en el sujeto. Los métodos para extraer células del sujeto para el tratamiento ex vivo, seguido de la reintroducción en el sujeto, son conocidos de la técnica. Alternativamente, el vector VAAr se introduce en las células de otro sujeto, en células en cultivo o en células de cualquier otra fuente adecuada, y las células se administran en el sujeto que lo necesita.

30 Entre las células adecuadas para la terapia génica ex vivo se incluyen, aunque sin limitación, células hepáticas, células neurales (incluyendo células de los sistemas nerviosos central y periférico, en particular, células cerebrales), células de páncreas, células de bazo, fibroblastos (p.ej., fibroblastos de la piel), queratinocitos, células endoteliales, células epiteliales, mioblastos, células hematopoyéticas, células estromales de la médula ósea, células progenitoras y células madre.

35 Las dosis de las células para la administración en un sujeto variarán según la edad, condición y especie del sujeto, el tipo de célula, el ácido nucleico expresado por la célula, el modo de administración y similares. Típicamente, se administran por lo menos aproximadamente 10^2 a aproximadamente 10^8 , preferentemente aproximadamente 10^3 a aproximadamente 10^6 células en cada dosis. Preferentemente, las células se administran en una "cantidad terapéuticamente eficaz".

40 Una cantidad "terapéuticamente eficaz" tal como se utiliza en la presente memoria es una cantidad que resulta suficiente para aliviar (p.ej., mitigar, disminuir o reducir) por lo menos uno de los síntomas asociados a un estado de enfermedad. Alternativamente, una cantidad "terapéuticamente eficaz" es una cantidad que resulta suficiente para proporcionar alguna mejora en la condición del sujeto.

45 Un aspecto adicional de la invención es un vector de la invención para la utilización en un método de administración de un transgén en una célula en un sujeto. La administración de los vectores de la presente invención en un sujeto humano o en un animal que lo necesita puede ser mediante cualquier medio conocido de la técnica para la administración de vectores víricos.

50 Entre los modos ejemplificativos de administración se incluyen la administración oral, rectal, transmucosal, tópica, transdérmica, por inhalación, parenteral (p.ej., intravenosa, subcutánea, intradérmica, intramuscular e intraarticular) y similares, así como la inyección directa en un tejido u órgano, alternativamente, inyecciones intratecal, intramuscular directa, intraventricular, intravenosa, intraperitoneal, intranasal o intraocular. Pueden prepararse inyectables en formas convencionales, como soluciones o suspensiones líquidas, formas sólidas adecuadas para soluciones o suspensiones en líquidos previamente a la inyección, o como emulsiones. Alternativamente, puede administrarse el virus de manera local y no sistémica, por ejemplo en una formulación de depósito o de liberación sostenida.

60 En algunos casos, la secuencia de nucleótidos de interés puede administrarse en el hígado del sujeto. La administración en el hígado puede llevarse a cabo mediante cualquier método conocido de la técnica, incluyendo, aunque sin limitación, la administración intravenosa, la administración intraportal, la administración intrabiliar, la administración intraarterial y la inyección directa en el parénquima hepático.

65 Preferentemente, las células (p.ej., las células hepáticas) se inyectan con un vector parvovirus recombinante

codificante de un péptido o proteína, las células expresan el péptido o proteína codificado y lo secretan al sistema circulatorio en una cantidad terapéuticamente eficaz (tal como se ha indicado anteriormente). Alternativamente, el vector se administra y se expresa en otras células o tejidos, incluyendo, aunque sin limitación, el cerebro, el páncreas, el bazo o los músculos.

En otras situaciones, las partículas de parvovirus se administran por vía intramuscular, más preferentemente mediante inyección intramuscular o mediante administración local (tal como se ha indicado anteriormente). En otras situaciones preferentes, las partículas de parvovirus de la presente invención se administran en los pulmones.

El vector parvovirus dado a conocer en la presente memoria puede administrarse en los pulmones de un sujeto mediante cualquier medio adecuado, aunque preferentemente se administra mediante una suspensión de aerosol de partículas respirables que comprenden vectores parvovirus inventivos, que el sujeto inhala. Las partículas respirables pueden ser líquidas o sólidas. Los aerosoles de partículas líquidas que comprenden los vectores parvovirus inventivos pueden producirse mediante cualquier medio adecuado, tal como un nebulizador de aerosol presurizado o un nebulizador ultrasónico, tal como es conocido por el experto en la materia. Ver, p.ej., la patente US nº 4.501.729. Los aerosoles de partículas sólidas que comprenden los vectores víricos inventivos pueden producirse, de manera similar, con cualquier generador de aerosol de medicamento en partículas sólido, mediante técnicas farmacéuticas conocidas.

Las dosis de las partículas de parvovirus indicadas en la presente memoria dependerán del modo de administración, la enfermedad o condición que debe tratarse, la condición del sujeto individual, el vector vírico particular y el gen que debe administrarse y pueden determinarse de una manera rutinaria. Las dosis ejemplares para conseguir efectos terapéuticos son títulos de virus de por lo menos aproximadamente 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} , 10^{14} , 10^{15} , 10^{16} unidades transductoras o más preferentemente, aproximadamente 10^8 a 10^{13} unidades transductoras, todavía más preferentemente 10^{12} unidades transductoras.

En casos particulares, puede utilizarse más de una administración (p.ej., dos, tres, cuatro o más administraciones) para conseguir niveles terapéuticos de expresión génica. De acuerdo con lo anterior y tal como se ha indicado anteriormente, los parvovirus que contiene VP1.5 se administran para reducir la incidencia de anticuerpos neutralizadores en el sujeto que debe tratarse o para prevenir el desarrollo de una respuesta inmunológica en el sujeto. Al sujeto se le pueden presentar vectores víricos aparentemente nuevos mediante el empaquetamiento del genoma de VAAr dentro de un abanico de cápsides de parvovirus híbrido o quimérico.

En resumen, pueden utilizarse vectores parvovirus, reactivos y métodos dados a conocer en la presente memoria para dirigir un ácido nucleico a células en división o que no se dividen, y para expresar establemente el ácido nucleico heterólogo en las mismas. Utilizando dicho sistema de vector, ahora resulta posible introducir en las células, in vitro o in vivo, genes que codifican proteínas que afectan a la fisiología celular. De esta manera, los vectores de la presente invención pueden resultar útiles en la terapia génica para estados de enfermedad o para la modificación experimental de la fisiología celular.

El ejemplo a continuación se proporciona con el fin de ilustrar determinadas formas de realización de la invención.

Ejemplo

Una variante de composición de cápside que contiene cuatro proteínas VP causada por un nuevo codón de inicio en la posición 219 de la secuencia de nucleótidos de cap de VAA8

Los vectores de virus adenoasociado de serotipo 8 recombinante generados mediante transfección transitoria de células HEK293 y purificados ampliamente mediante etapas combinadas de cromatografía de columna y de ultracentrifugación en gradiente se observó que contenían una banda de VP además de VP1, 2 y 3 canónicas al evaluarlas mediante SDS-PAGE / tinción de plata. La banda adicional migrada a una posición intermedia entre VP1 y VP2 se determinó que era una proteína VP mediante transferencia western utilizando el anticuerpo monoclonal B1 y se denominó "VP1.5". Ver las figuras 1 y 5. La secuenciación del plásmido de empaquetamiento utilizado para generar este vector indicaba una diferencia en un único nucleótido respecto a la secuencia esperada de cap de VAA8, con G en sustitución de C en la posición 219. Se predice que dicho intercambio de nucleótido no cambiará la secuencia de aminoácidos de las proteínas codificadas, excepto por la posibilidad de que, en el caso de que se cree un codón de inicio, es probable que se encuentre el aminoácido metionina en la posición aminoterminal de un nuevo polipéptido. Dicho cambio de nucleótido no resulta en un codón CTG que ha sido descrito como un codón de inicio alternativo (Clause et al., 2003) y aparentemente actúa como un codón de inicio en una posición intermedia entre los codones de inicio de VP1 y VP2 en las células de mamífero utilizadas para producir vector. Estimada por la intensidad de la banda utilizando tinción de plata o la tinción de azul de Coomassie (con una carga más elevada) de los geles de SDS-PAGE, se encontraba presenta la banda de VP1.5 anómala en una cantidad comparable a VP1 y VP2. El análisis dinámico de dispersión de la luz para evaluar el tamaño de partícula indicó que las partículas de VAA8 altamente purificadas que contenían VP1.5 eran

comparables a las VAA8 recombinantes normales, mostrando ambos un radio aproximado de 13 nm. El examen de las partículas de VAA8 normales y que contenían VP1.5 mediante microscopía electrónica con tinción negativa indicó un tamaño y morfología similares; sin embargo, se observó cierta pérdida de estructura homogénea y estructura, y mayor evidencia de fragmentación en las partículas variantes (VAA8.1), observaciones consistentes con una estabilidad menor de las cápsides.

En un experimento lado a lado para caracterizar la actividad funcional de la variante VP1.5 (ver la figura 4), se empaquetó un casete de expresión FIX de coagulación humano controlado por el promotor antitripsina alfa1 (hAAT) específico de hígado utilizando cápsides de variante VP1.5 o normales y los vectores se purificaron utilizando un método de purificación optimizado mediante ultracentrifugación en doble gradiente de cesio (Grimm et al., 2005; Ayuso et al., 2010). Basándose en la titulación mediante dos métodos (basado en proteínas y qPCR) para garantizar la comparabilidad, se inyectaron los vectores respectivos por la vena de la cola en ratones B57/B16 a una dosis de $2,5 \times 10^{10}$ vg/ratón (cinco ratones para cada dosis). Ambos vectores resultaron en un nivel elevado de expresión indistinguible de hFIX en todos los puntos temporales sometidos a ensayo (2, 4 y 6 semanas) con >75 µg/ml de hFIX circulante medido en la semana 6. Los animales que recibieron la cápside variante mostraron una respuesta de IgG anti-cápside más baja que los ratones en los que se habían inyectado VAA8. Estos datos caracterizan una nueva composición de cápside observada en VAA8 recombinante, causado por un nuevo codón de inicio traduccional en la cap, que conserva la estructura y actividad funcional normales.

Se llevó a cabo mutagénesis dirigida a sitio en un plásmido empaquetador de vector que contenía las secuencias para VAA rep y VAA8 cap y los promotores apropiados, para cambiar la secuencia de ATG en la posición 1 de VAA8 cap a GGG, o cualquier otro codón que no es un codón de inicio y para cambiar el codón natural (de tipo salvaje) en la posición 177 de VAA8 cap de 'CTC' a 'CTG' o 'ATG', introduciendo de esta manera un codón de inicio en esta posición. Este plásmido empaquetador de vector modificado se utilizó para la generación junto con un plásmido ayudante codificante de las funciones requeridas de virus ayudante y un plásmido vector codificante de un genoma de vector que comprendía el casete de expresión del factor de coagulación humano IX, mediante la transfección transitoria libre de virus ayudante de células HEK293, y se purificó el vector resultante, tal como se ha descrito anteriormente (revisión en Wright J.F., Transient transfection methods for clinical VAA vector production, Human Gene Therapy 20:698-706, 2009). Los vectores purificados resultantes, compuestos de VP1.5, VP2 y VP3, se fabricaron y se sometieron a una caracterización apropiada y ensayos de control de calidad, tal como se ha descrito anteriormente (revisión en Wright, J.F, Manufacturing and characterizing VAA-based vector for use in clinical studies, Gene Therapy 15:840-848, 2008). El vector se administró en personas con hemofilia B para llevar a cabo la transferencia génica terapéutica, resultando en una mejora de los síntomas de su enfermedad de hemofilia B.

Estos datos indican que la longitud y composición de la proteína de cápside VP puede aprovecharse para optimizar adicionalmente los vectores recombinantes, proporcionando de esta manera una administración mejorada de transgenes terapéuticos en pacientes que necesitan dicho tratamiento.

Referencias

Nathwani, A., Tuddenham, E., Rosales, C., McIntosh, J., Riddell, A., Rustgi, P., Glader, B., Kay, M., Allay, J., Coleman, J., Sleep, S., High, K.A., Mingozzi, F., Gray, J.T., Reiss, U.M., Nienhuis, A.W., Davidoff, A., 2010. Early clinical trial results following administration of a low dose of a novel self complementary adeno-associated viral vector encoding human Factor IX in two subjects with severe hemophilia B. Blood 116, 114.

Manno, C.S., Arruda, V.R., Pierce, G.F, Glader, B., Ragni, M., Rasko, J., Ozelo, M.C., Hoots, K., Blatt, P., Konkle, B., Dake, M., Kaye, R., Razavi, M., Zajko, A., Zehnder, J. Nakai, H., Chew, A., Leonard, D., Wright, J.F., Lessard, R.R, Sommer J.M., Tigges, M., Sabatino, D., Luk, A., Jiang, H., Mingozzi, F., Couto, L, Ertl, H.C., High, K.A., Kay, M.A., 2006. Successful transduction of liver in hemophilia by VAA-factor IX and limitations imposed by the host immune response. Nature Medicine 12: 342-347.

Claus, P, Doring F, Gringel S, Muller-Ostermeyer F, Fuhlrott J, Kraft T, Grothe C., 2003. Differential intranuclear localization of fibroblast growth factor-2 isoforms and specific interactions with the survival of motoneuron protein. Journal of Biological Chemistry 278:479-485.

REIVINDICACIONES

1. Vector de virus adenoasociado (VAA) que presenta un serotipo de VAA1, VAA6, VAA8 o VAA9, que comprende:
 - (i) una cápside que comprende una proteína VP1.5 de VAA1, VAA6, VAA8 o VAA9, respectivamente;
 - (ii) un minigén que comprende repeticiones terminales invertidas de VAA; y
 - (iii) una secuencia de ácidos nucleicos heteróloga ligada funcionalmente a secuencias reguladoras que dirigen la expresión de un producto a partir de la secuencia de ácidos nucleicos heteróloga en una célula hospedadora; en el que
 - (a) dicho vector de VAA es un VAA8 y dicha proteína VP1.5 consiste en la secuencia de aminoácidos representada en la figura 5, panel A, en el que el aminoácido en el extremo amino es una leucina o en el que dicha proteína VP1.5 consiste en la secuencia de aminoácidos representada en la figura 5, panel B, en el que el aminoácido en el extremo amino es una metionina; o
 - (b) el vector de VAA se selecciona de entre el grupo que consiste en VAA1, VAA6 y VAA9, y comprende un codón CTG variante en lugar de un CTC natural en la posición 219 de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína cap; o
 - (c) dicho vector de VAA es un vector VAA8 y comprende un codón de inicio CTG variante en la posición 177 de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína cap.
2. Vector VAA según la reivindicación 1, que comprende además las proteínas de cápside VP1, VP2 y VP3.
3. Vector VAA según la reivindicación 2, en el que dicho vector de VAA carece de VP1.
4. Vector VAA según la reivindicación 2 o 3, que es el VAA8.
5. Vector VAA según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el producto de expresión de la secuencia de ácidos nucleicos heteróloga es un péptido terapéutico.
6. Vector VAA según la reivindicación 5, en el que el péptido terapéutico es un factor de coagulación seleccionado de entre el grupo que consiste en una molécula de ARNi antivírico, factor VIII, factor IX o un fragmento funcional de los mismos.
7. Vector VAA según la reivindicación 1 o 3, en el que el producto de expresión de la secuencia de ácidos nucleicos heteróloga es IgG, IgM, IgA, IgD, IgE, inmunoglobulina quimérica, anticuerpo humanizado o un anticuerpo monocatenario.
8. Vector VAA8 según la reivindicación 4, en el que el producto de expresión de la secuencia de ácidos nucleicos heteróloga es una inmunoglobulina quimérica o un anticuerpo monocatenario.
9. Vector VAA según la reivindicación 6, en el que dicha molécula de ARNi antivírico dianiza el VHC.
10. Composición farmacéutica que comprende el vector de VAA según la reivindicación 1 o 3 y un portador fisiológicamente compatible para el mismo.
11. Cultivo celular que comprende el vector VAA8 según la reivindicación 4.
12. Vector VAA según la reivindicación 1 o 3 para la utilización en un método de suministro de un transgén a una célula en un sujeto.
13. Vector VAA para la utilización según la reivindicación 12, en el que dicho transgén es el factor IX o el factor VIII.
14. Cultivo celular que comprende el vector de VAA según la reivindicación 1.
15. Vector de virus adenoasociado (VAA) que es el serotipo VAA8 que comprende las proteínas de cápside VP1, VP2, VP3 y VP1.5 respectivas, un minigén que comprende repeticiones terminales invertidas de VAA y una secuencia de ácidos nucleicos heteróloga ligada funcionalmente a unas secuencias reguladoras que dirigen la expresión de un producto a partir de la secuencia de ácidos nucleicos heteróloga en una célula hospedadora;
 - en el que dicha proteína VP1.5 consiste en la secuencia de aminoácidos representada en la figura 5, panel A,

en el que el aminoácido en el extremo amino es una leucina; o

en el que dicha proteína VP1.5 consiste en la secuencia de aminoácidos representada en la figura 5, panel B,
en el que el aminoácido en el extremo amino es una metionina.

5

1, 2: VAA8r

3: VAA2r

4: VAA8.1r

1

2

3

4

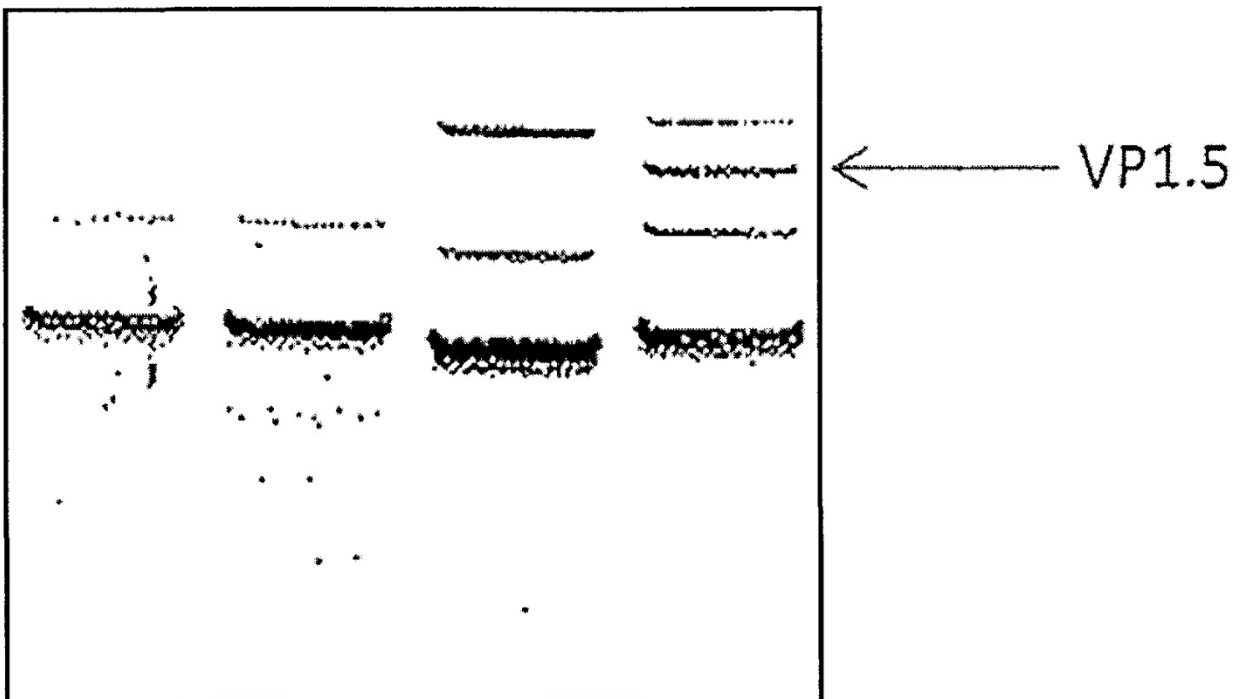


Figura 1

VAA8 Cap (genóteca F513852.1) vs. secuencia completa de plásmido pAAB8PK

		2375		2424
VAA8 - cap	(1)	-----ATGGCTGCCGATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACA		
pVAA8PK SeqWright Jul 08	(2375)	TAAATCAGGTATGGCTGCCGATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACA		
		2425		2474
VAA8 - cap	(41)	ACCTCTCTGAGGGCATTTCGCGAGTGGTGGGCGCTGAAACCTGGAGCCCCG		
pVAA8PK SeqWright Jul 08	(2425)	ACCTCTCTGAGGGCATTTCGCGAGTGGTGGGCGCTGAAACCTGGAGCCCCG		
		2475		2524
VAA8 - cap	(91)	AAGCCCAAAGCCAACCAGCAAAGCAGGACGACGGCCGGGTCTGGTGTCT		
pVAA8PK SeqWright Jul 08	(2475)	AAGCCCAAAGCCAACCAGCAAAGCAGGACGACGGCCGGGTCTGGTGTCT		
		2525		2574
VAA8 - cap	(141)	TCCTGGCTACAAGTACCTCGGACCCCTTCAACGGACTCGACAAGGGGGAGC		
pVAA8PK SeqWright Jul 08	(2525)	TCCTGGCTACAAGTACCTCGGACCCCTTCAACGGACTCGACAAGGGGGAGC		
		2575		2624
VAA8 - cap	(191)	CCGTCAACGCGGGCGGACGCAGCGGCCCTCGAGCAGACAAGGCCTACGAC		
pVAA8PK SeqWright Jul 08	(2575)	CCGTCAACGCGGGCGGACGCAGCGGCCCTCGAGCAGACAAGGCCTACGAC		
		2625		2674
VAA8 - cap	(241)	CAGCAGCTGCAGGCGGGTGACAATCCGTACCTGCGGTATAACACGCCGA		
pVAA8PK SeqWright Jul 08	(2625)	CAGCAGCTGCAGGCGGGTGACAATCCGTACCTGCGGTATAACACGCCGA		
		2675		2724
VAA8 - cap	(291)	CGCCGAGTTTCAGGAGCGTCTGCAAGAAGATACGTCTTTTGGGGCAACC		
pVAA8PK SeqWright Jul 08	(2675)	CGCCGAGTTTCAGGAGCGTCTGCAAGAAGATACGTCTTTTGGGGCAACC		
		2725		2774
VAA8 - cap	(341)	TCGGGCGAGCAGTCTTCCAGGCCAAGAAGCGGGTTCTCGAACCTCTCGGT		
pVAA8PK SeqWright Jul 08	(2725)	TCGGGCGAGCAGTCTTCCAGGCCAAGAAGCGGGTTCTCGAACCTCTCGGT		
		2775		2824
VAA8 - cap	(391)	CTGGTTGAGGAAGGCGCTAAGACGGCTCCTGGAAAGAAGAGACCGGTAGA		
pVAA8PK SeqWright Jul 08	(2775)	CTGGTTGAGGAAGGCGCTAAGACGGCTCCTGGAAAGAAGAGACCGGTAGA		
		2825		2874
VAA8 - cap	(441)	GCCATCACCCAGCGTTCTCCAGACTCCTCTACGGGCATCGGCAAGAAAG		
pVAA8PK SeqWright Jul 08	(2825)	GCCATCACCCAGCGTTCTCCAGACTCCTCTACGGGCATCGGCAAGAAAG		
		2875		2924
VAA8 - cap	(491)	GCCAACAGCCCGCCAGAAAAGACTCAATTTTGGTCAGACTGGCGACTCA		

Figura 2

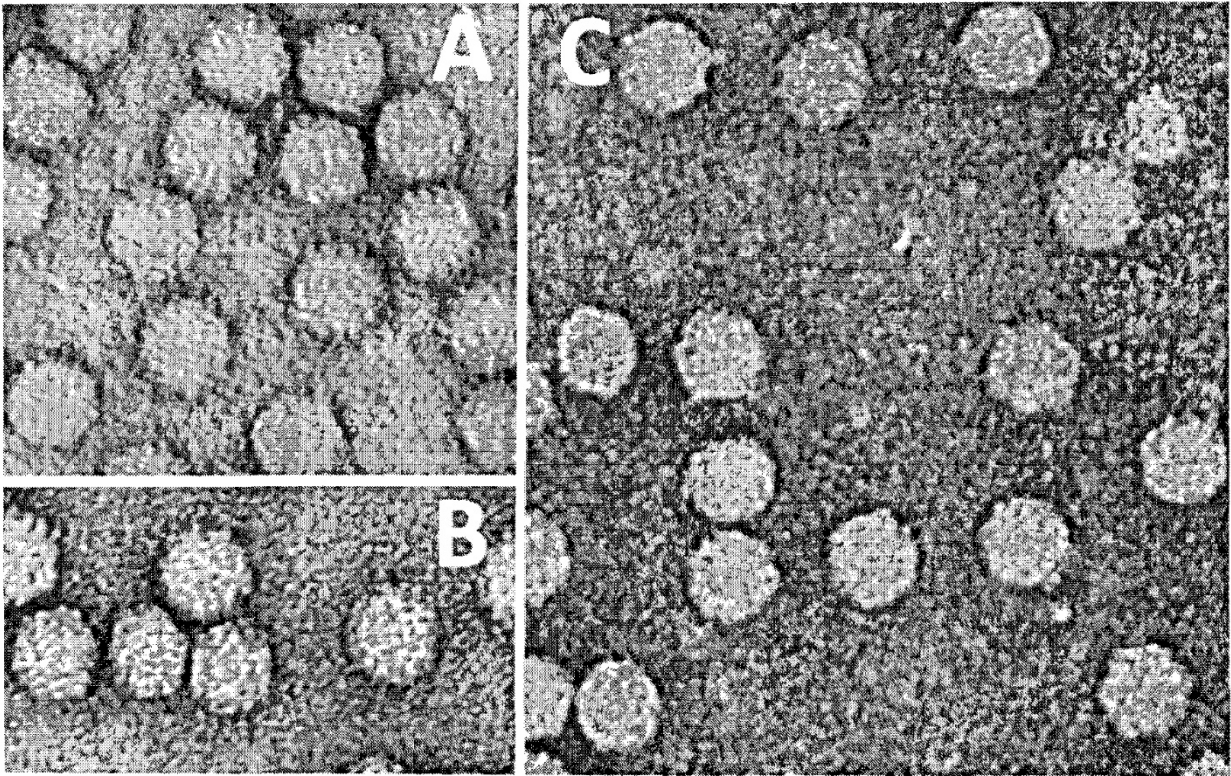
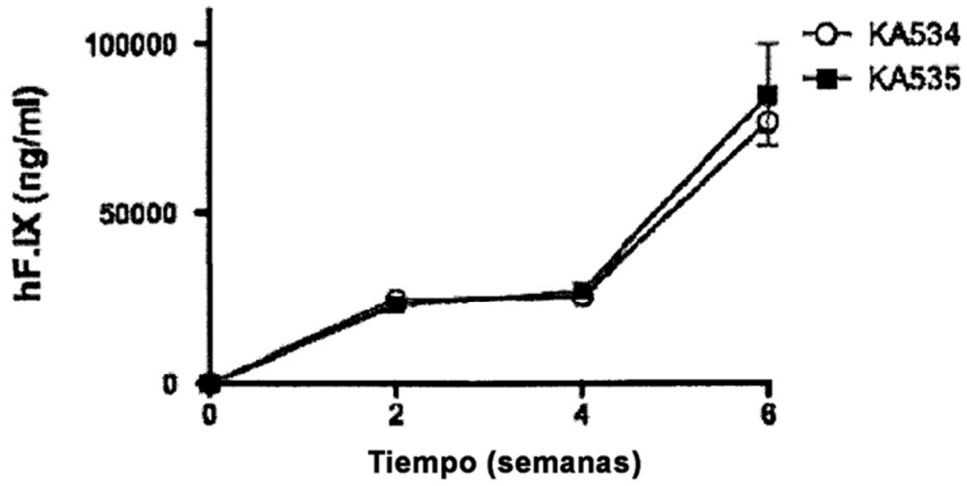


Figura 3

Grupo	Vector	N	Título (vg/ml)	Dosis / animal
VAA8-hFIX16	KA434	5	2.20E+13	2.50E+10
VAA8-hFIX16	KA535 (VP1.5)*	5	1.30E+13	2.50E+10

A

Curso temporal



B

Semana 6

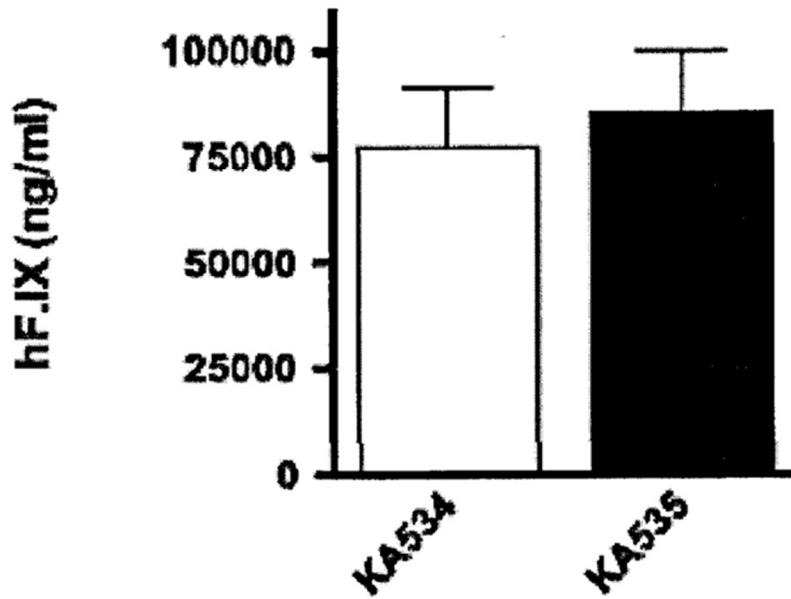


Figura 4

Secuencia de VAA8 VP1.5: Panel A (premisa: leucina en posición 1)

1
 LEHDKAYDQQ LQAGDNPYLR YNHADAEFQE RLQEDTSFGG NLGRAVFQAK
 51
 KRVLEPLGLV EEGAKTAPGK KRPVEPSPQR SPDSSTGIGK KGQQPARKRL
 101
 NFGQTGDSES VPDPQPLGEP PAAPSGVGPN TMAAGGGAPM ADNNEGADGV
 151
 GSSSGNWHCD STWLGDRVIT TSTRTWALPT YNNHLYKQIS NGTSGGATND
 201
 NTYFGYSTPW GYDFENRFHC HFSPRDWQRL INNNWGFRPK RLSFKLENIQ
 251
 VKEVTQNEGT KTIANNLTST IQVFTDSEYQ LPYVLGSAHQ GCLPPFPADV
 301
 FMIPOYGYLT LNNGSQAVGR SSFYCLEYFP SQMLRTGNNF QFTYTFEDVP
 351
 FHSSYAHSQS LDRLMNPLID QYLYLSRTQ TTGGTANTQT LGFSQGGPNT
 401
 MANQAKNWLP GPCYRQORVS TTTGQNNNSN FAWTAGTKYH LNGRNSLANP
 451
 GIAMATHKDD EERFFPSNGI LIFGKQNAAR DNADYSDVML TSEEEIKTTN
 501
 PVATEEYGIV ADNLOQONTA PQIGTVNSQG ALPGMVWQNR DVYLOGPIWA
 551
 KIPHTDGNFH PSPLMGGFGL KHPPPQILIK NTPVPADPPT TFNQSKLNSE
 601
 ITQYSTGQVS VEIEWELOKE NSKRWNPEIQ YTSNYYKSTS VDFAVNTEGV
 651
 YSEPRPIGTR YLTRNL

Secuencia de VAA8 VP1.5: Panel B (premisa: metionina en posición 1)

1
 MEHDKAYDQQ LQAGDNPYLR YNHADAEFQE RLQEDTSFGG NLGRAVFQAK
 51
 KRVLEPLGLV EEGAKTAPGK KRPVEPSPQR SPDSSTGIGK KGQQPARKRL
 101
 NFGQTGDSES VPDPQPLGEP PAAPSGVGPN TMAAGGGAPM ADNNEGADGV
 151
 GSSSGNWHCD STWLGDRVIT TSTRTWALPT YNNHLYKQIS NGTSGGATND
 201
 NTYFGYSTPW GYDFENRFHC HFSPRDWQRL INNNWGFRPK RLSFKLENIQ
 251
 VKEVTQNEGT KTIANNLTST IQVFTDSEYQ LPYVLGSAHQ GCLPPFPADV
 301
 FMIPOYGYLT LNNGSQAVGR SSFYCLEYFP SQMLRTGNNF QFTYTFEDVP
 351
 FHSSYAHSQS LDRLMNPLID QYLYLSRTQ TTGGTANTQT LGFSQGGPNT
 401
 MANQAKNWLP GPCYRQORVS TTTGQNNNSN FAWTAGTKYH LNGRNSLANP
 451
 GIAMATHKDD EERFFPSNGI LIFGKQNAAR DNADYSDVML TSEEEIKTTN
 501
 PVATEEYGIV ADNLOQONTA PQIGTVNSQG ALPGMVWQNR DVYLOGPIWA
 551
 KIPHTDGNFH PSPLMGGFGL KHPPPQILIK NTPVPADPPT TFNQSKLNSE
 601
 ITQYSTGQVS VEIEWELOKE NSKRWNPEIQ YTSNYYKSTS VDFAVNTEGV
 651
 YSEPRPIGTR YLTRNL

Figura 5

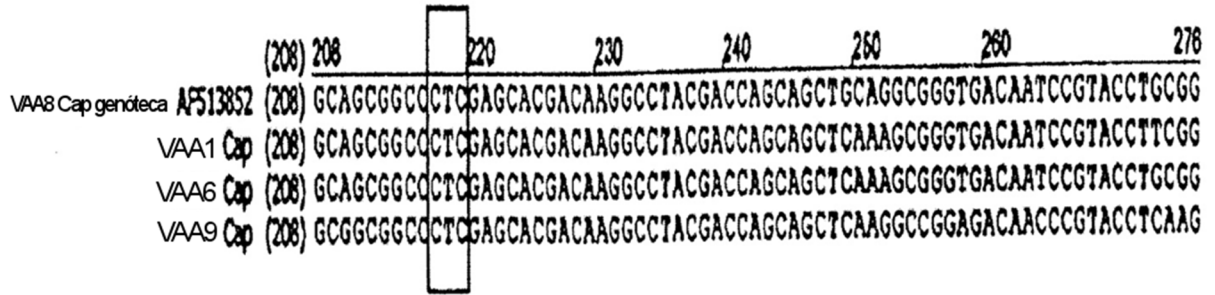


Figura 6

VAA8 Cap (genóteca F513852.1) vs. secuencia completa de plásmido pAAB8PK

			2375		2424
	VAA8 - cap	(1)	-----ATGGCTGCCGATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACA		
pVAA8PK	SeqWright Jul 08	(2375)	TAAATCAGGTATGGCTGCCGATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACA		
			2425		2474
	VAA8 - cap	(41)	ACCTCTCTGAGGGCATTTCGGAGTGGTGGGGCTGAAACCTGGAGCCCCG		
pVAA8PK	SeqWright Jul 08	(2425)	ACCTCTCTGAGGGCATTTCGGAGTGGTGGGGCTGAAACCTGGAGCCCCG		
			2475		2524
	VAA8 - cap	(91)	AAGCCCAAAGCCAACCAGCAAAGCAGGACGACGGCCGGGGTCTGGTGCT		
pVAA8PK	SeqWright Jul 08	(2475)	AAGCCCAAAGCCAACCAGCAAAGCAGGACGACGGCCGGGGTCTGGTGCT		
			2525		2574
	VAA8 - cap	(141)	TCCTGGCTACAAGTACCTCGGACCCCTTCAACGGACTCGACAAGGGGGAGC		
pVAA8PK	SeqWright Jul 08	(2525)	TCCTGGCTACAAGTACCTCGGACCCCTTCAACGGACTCGACAAGGGGGAGC		
			2575		2624
	VAA8 - cap	(191)	CCGTCAACGCGGGCGGACGCGAGCGGCCCTGGAGCAGCACAAGGCCTACGAC		
pVAA8PK	SeqWright Jul 08	(2575)	CCGTCAACGCGGGCGGACGCGAGCGGCCCTGGAGCAGCACAAGGCCTACGAC		
			2625		2674
	VAA8 - cap	(241)	CAGCAGCTGCAGGCGGGTGACAATCCGTACCTGCGGTATAACCACGCCGA		
pVAA8PK	SeqWright Jul 08	(2625)	CAGCAGCTGCAGGCGGGTGACAATCCGTACCTGCGGTATAACCACGCCGA		
			2675		2724
	VAA8 - cap	(291)	CGCCGAGTTTCAGGAGCGTCTGCAAGAAGATACGTCTTTTGGGGCAACC		
pVAA8PK	SeqWright Jul 08	(2675)	CGCCGAGTTTCAGGAGCGTCTGCAAGAAGATACGTCTTTTGGGGCAACC		
			2725		2774
	VAA8 - cap	(341)	TCGGGCGAGCAGTCTTCCAGGCCAAGAAGCGGGTTCTCGAACCTCTCGGT		
pVAA8PK	SeqWright Jul 08	(2725)	TCGGGCGAGCAGTCTTCCAGGCCAAGAAGCGGGTTCTCGAACCTCTCGGT		
			2775		2824
	VAA8 - cap	(391)	CTGGTTGAGGAAGGCGCTAAGACGGCTCCTGGAAAGAAGAGACCGGTAGA		
pVAA8PK	SeqWright Jul 08	(2775)	CTGGTTGAGGAAGGCGCTAAGACGGCTCCTGGAAAGAAGAGACCGGTAGA		
			2825		2874
	VAA8 - cap	(441)	GCCATCACCCAGCGTTCTCCAGACTCCTCTACGGGCATCGGCAAGAAAG		
pVAA8PK	SeqWright Jul 08	(2825)	GCCATCACCCAGCGTTCTCCAGACTCCTCTACGGGCATCGGCAAGAAAG		
			2875		2924
	VAA8 - cap	(491)	GCCAACAGCCCGCCAGAAAAAGACTCAATTTTGGTCAGACTGGCGACTCA		

Figura 7