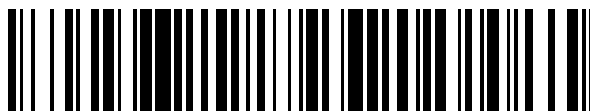


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 710 452**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/867** (2006.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.06.2012 PCT/US2012/041693**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.12.2012 WO12170911**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.06.2012 E 12796252 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.09.2018 EP 2717922**

54 Título: **Vectores de terapia génica para la adrenoleucodistrofia y la adrenomieloneuropatía**

30 Prioridad:

**10.06.2011 US 201161495857 P**

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

**25.04.2019**

73 Titular/es:

**BLUEBIRD BIO, INC. (100.0%)  
60 Binney Street  
Cambridge, MA 02142, US**

72 Inventor/es:

**DENARO, MARIA JOANN;  
FINER, MITCHELL HOWARD y  
VERES, GABOR**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 710 452 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 de terapia génica para la adrenoleucodistrofia y la adrenomieloneuropatía

**Antecedentes****Campo técnico**

- 5 La presente invención se refiere generalmente a vectores de terapia génica. En particular, la presente invención se refiere a vectores lentivirales que proporcionan terapia génica para la adrenoleucodistrofia y la adrenomieloneuropatía.

**Descripción de la técnica relacionada**

- 10 La adrenoleucodistrofia cerebral infantil (CCALD) es un trastorno neurológico genético ligado al cromosoma X muy raro, a veces rápidamente progresivo en niños varones (edad media de edad de aparición 7; intervalo 3-15 años) que, si no se trata, conduce a un estado vegetativo, y en última instancia a la muerte, en el plazo de una media de 5 años tras el diagnóstico.

- 15 La CCALD a menudo se presenta inicialmente como enfermedad de Addison, pero el diagnóstico se realiza habitualmente basándose en disminuciones "repentinas" de atención, pensamiento, concentración, y otras funciones cerebrales con hallazgos confirmatorios de desmielinización cerebral en imágenes de resonancia magnética (MRI). Antes de la desmielinización, la MRI del cerebro del paciente es normal, y no hay anomalías en el desarrollo neurológico. El transcurso clínico puede ser "lento" al principio, pero puede volverse rápidamente progresivo e irreversible con la pérdida generalizada de mielina en el cerebro. Los términos "lento" y "repentino" son relativos en que la duración de desmielinización no se conoce realmente, pero la rápida disminución de la función cognitiva y motora puede producirse en cualquier momento y por motivos desconocidos. En efecto, los cambios en la MRI preceden a los síntomas, y pueden ser completamente anómalos con desmielinización generalizada en un momento cuando hay muy pocas manifestaciones clínicas de la enfermedad. La incidencia de adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X (ALD) en los Estados Unidos es de aproximadamente 1:21.000 nacimientos de varones con aproximadamente el 35% que desarrolla CCALD; se diagnostican aproximadamente de 35 a 40 niños varones con CCALD cada año. La causa de la enfermedad es una mutación del gen de miembro 1 (ABCD1), de la subfamilia D (ALD), de casete de unión a ATP que conducía a un producto génico de la proteína de adrenoleucodistrofia disfuncional o ausente (ALDP). La ALDP se localiza en los peroxisomas celulares, donde participa en la degradación de ácidos grasos de cadena muy larga (VLCFA) (longitudes de cadena de > 20 carbonos) a ácidos grasos más cortos, que se usan para mantener la estructura y función celulares.

- 30 La fisiopatología de las manifestaciones en el sistema nervioso central (SNC) de CCALD no se entiende bien, pero la desmielinización surge debido a una acumulación local de VLCFA que no puede metabolizarse porque la ALDP defectuosa no admite ese proceso en la microglía cerebral. La fase rápidamente progresiva de la enfermedad está provocada por inflamación, posiblemente provocada por acilación de proteínas celulares por los VLCFA, lo que aumenta la pérdida de mielina. La fase rápidamente progresiva de CCALD puede dar como resultado que un niño se deteriore desde una capacidad funcional normal a estar gravemente discapacitado en el plazo de meses.

- 40 El único tratamiento disponible es el trasplante de células madre hematopoyéticas alogénicas (HCT) para proporcionar células que producen ALDP funcional. Puesto que las microglías cerebrales se derivan de la médula ósea, el trasplante de células madre humanas de un donante emparentado totalmente compatible usando células que producen ALDP funcional puede mejorar o detener potencialmente el avance de la desmielinización. Sin embargo, dado que se tarda de 12 a 18 meses en que el HCT alogénico estabilice la enfermedad, y dada la naturaleza progresiva de la enfermedad, el trasplante debe realizarse lo antes posible tras el diagnóstico. Esto es a veces problemático debido a los tiempos de anticipación diagnóstica necesarios para encontrar donantes de células madre de médula ósea emparentados o no emparentados compatibles. El uso de células madre alógenicas también presenta un riesgo de fallo del injerto y el desarrollo de enfermedad injerto contra huésped aguda y crónica (GvHD).
- 45 Estas complicaciones pueden conducir a muerte y su incidencia aumenta cuando se usan donantes no emparentados como fuente de células madre hematopoyéticas alogénicas.

- Otra fuente de reemplazo de ALDP es el uso de trasplantes de células de sangre del cordón umbilical compatibles, más normalmente, parcialmente compatibles. El uso de células madre de sangre del cordón umbilical (CBSC) es problemático, con un riesgo de fallo del injerto y tiempo prolongado para incorporación del injerto lo que requiere soporte de transfusión prolongado. En efecto, todas las formas de HCT alogénico implican un 10-15% de riesgo de mortalidad relacionada con el trasplante, y hasta un 30% de riesgo de enfermedad de injerto contra huésped crónica. Biffi *et al.*, Hum Mol Genet., 2011,20(R1):R42-53, dan a conocer una estrategia de terapia génica para tratar leucodistrofias usando vectores lentivirales. El documento WO 02/087341 da a conocer LTR retrovirales para su uso en vectores lentivirales de terapia génica.

- 55 Por tanto, existe la necesidad en la técnica de terapias contra la adrenoleucodistrofia más seguras y más eficaces. La presente invención proporciona soluciones a estos y otros problemas.

**Breve resumen**

Por tanto, la aparición de la frase "en una realización" en diversos sitios en la totalidad de esta memoria descriptiva no se refiere necesariamente a la misma realización. Además, los rasgos, estructuras o características particulares pueden combinarse de cualquier manera adecuada en una o más realizaciones.

5 La presente invención se refiere a un vector lentiviral que comprende: (a) una LTR de VIH-1 izquierda (5'); (b) una señal de empaquetamiento Psi ( $\Psi$ ); (c) un tramo de polipurina central/fragmento de ADN (cPPT/FLAP); (d) un elemento de exportación retroviral de RRE; y (e) un promotor con sitio de unión a cebador dl587rev sustituido, con región de control negativo delecionada, potenciador del virus del sarcoma mieloproliferativo (MND), unido operativamente a un ADNc que codifica para un polipéptido de casete de unión a ATP humano, subfamilia D, miembro 1 (ABCD1); (f) una LTR de VIH-1 de autoinactivación (SIN) derecha (3'); y (g) una secuencia de poliadenilación de  $\beta$ -globina de conejo sintética; en el que el vector lentiviral no comprende un elemento regulador postranscripcional de marmota (WPRE).

La presente invención se refiere además a una célula de mamífero que comprende dicho vector lentiviral.

15 La presente invención se refiere además a una célula de empaquetamiento que comprende: un primer polinucleótido que codifica para gag, un segundo polinucleótido que codifica para pol, un tercer polinucleótido que codifica para env y dicho vector lentiviral.

La presente invención se refiere además a una célula productora que comprende dicho vector lentiviral.

La presente invención se refiere además a una partícula de vector producida por dicha célula productora.

20 La presente invención se refiere además a una célula huésped transducida con dicho vector lentiviral, en la que la célula es una célula madre somática, una célula progenitora o una célula madre hematopoyética, y en la que la célula no es una célula madre embrionaria humana.

La presente invención se refiere además a una célula progenitora o madre hematopoyética transducida con dicho vector, para su uso en un método de tratamiento de adrenoleucodistrofia o adrenomielopatía.

25 La presente invención se refiere además a dicho vector lentiviral, para su uso en terapia génica, en el que la terapia génica trata o previene la adrenoleucodistrofia o adrenomielopatía.

30 En diversos ejemplos, la presente divulgación contempla, en parte, un vector que comprende: una LTR retroviral izquierda (5'); un tramo de polipurina central/fragmento de ADN (cPPT/FLAP); un elemento de exportación retroviral; un promotor activo en una célula microglial, unido operativamente a un polinucleótido que codifica para un polipéptido de casete de unión a ATP, subfamilia D, miembro 1 (ABCD1); y una LTR retroviral derecha (3'); en el que el vector no comprende un elemento regulador postranscripcional de marmota (WPRE).

En ejemplos particulares, el vector es un vector lentiviral.

En ejemplos relacionados, el lentivirus es VIH.

En ejemplos más particulares, el lentivirus es VIH-1.

En determinados ejemplos, el promotor de la LTR 5' se reemplaza con un promotor heterólogo.

35 En ejemplos adicionales, el promotor heterólogo es un promotor de citomegalovirus (CMV), un promotor de virus del sarcoma de Rous (VSR), o un promotor del virus de simio 40 (SV40).

En ejemplos adicionales particulares, el promotor heterólogo es un promotor de CMV.

En ejemplos adicionales, la LTR 5' o LTR 3' es una LTR lentiviral.

En otros ejemplos, la LTR 5' y LTR 3' son LTR lentivirales.

40 En determinados ejemplos particulares, el lentivirus es VIH-1.

En ejemplos particulares, la LTR 3' comprende una o más modificaciones.

En determinados ejemplos particulares, la LTR 3' comprende una o más deleciones.

En ejemplos adicionales, la LTR 3' es una LTR de autoinactivación (SIN).

En algunos ejemplos, el elemento de exportación retroviral es un elemento de respuesta rev (RRE).

45 En ejemplos adicionales, el cPPT/FLAP es de VIH-1.

## ES 2 710 452 T3

En determinados ejemplos, el promotor comprende un promotor sustituido de sitio de unión a cebador dl587rev en la región de control negativo delecionada, potenciador del virus del sarcoma mieloproliferativo (MND) o fragmento transcripcionalmente activo del mismo.

En ejemplos particulares, el polinucleótido que codifica para el polipéptido de ABCD1 es un ADNc.

- 5 En ejemplos relacionados, el ADNc comprende una secuencia de Kozak optimizada.

En determinados ejemplos, la secuencia de Kozak óptima es (GCC)RCCATGG, en la que R es una purina (A o G).

En ejemplos particulares, el polinucleótido codifica para un polipéptido de ABCD1 humano.

- 10 En diversos ejemplos, la presente divulgación contempla, en parte, un vector lentiviral que comprende: una LTR izquierda (5'); un cPPT/FLAP; un RRE; un promotor MND unido operativamente a un polinucleótido que codifica para un polipéptido de ABCD1 humano; una LTR derecha (3'); y una secuencia de poliadenilación; en el que el vector no comprende un elemento regulador postranscripcional de marmota (WPRE).

En ejemplos particulares, el vector lentiviral comprende una señal de empaquetamiento Psi ( $\Psi$ ).

En determinados ejemplos, la secuencia de poliadenilación es una secuencia de poliadenilación de  $\beta$ -globina de conejo de señal o poliadenilación de hormona del crecimiento bovino.

- 15 En determinados ejemplos particulares, el vector lentiviral comprende una LTR 5' o LTR 3' de VIH-1.

En ejemplos adicionales, la LTR 3' es una LTR de SIN.

- 20 En diversas realizaciones, la presente invención contempla, en parte, un vector lentiviral que comprende: una LTR de VIH-1 izquierda (5'); una señal de empaquetamiento Psi ( $\Psi$ ); un tramo de polipurina central/fragmento de ADN (cPPT/FLAP); un elemento de exportación retroviral de RRE; un promotor con sitio de unión a cebador dl587rev sustituido, con región de control negativo delecionada, potenciador del virus del sarcoma mieloproliferativo (MND), unido operativamente a un ADNc que codifica para un polipéptido de casete de unión a ATP humano, subfamilia D, miembro 1 (ABCD1); una LTR de VIH-1 de autoinactivación (SIN) derecha (3'); y una secuencia de poliadenilación de  $\beta$ -globina de conejo sintética; en el que el vector no comprende un elemento regulador postranscripcional de marmota (WPRE).

- 25 En diversas realizaciones, la presente invención contempla, en parte, una célula de mamífero que comprende un vector según la invención.

En realizaciones particulares, la presente invención contempla, en parte, una célula de empaquetamiento que comprende: un primer polinucleótido que codifica para gag, un segundo polinucleótido que codifica para pol, un tercer polinucleótido que codifica para env y un vector según la invención.

- 30 En determinadas realizaciones, la presente invención contempla, en parte, una célula productora que comprende un vector según la invención.

En realizaciones adicionales, la presente invención contempla, en parte, partículas de vector producidas por la célula productora.

- 35 En diversos ejemplos particulares, la presente divulgación contempla, en parte, un vector que comprende: al menos una LTR; un tramo de polipurina central/fragmento de ADN (cPPT/FLAP); un elemento de exportación retroviral; y un promotor activo en una célula microglial, unido operativamente a un polinucleótido que codifica para un polipéptido de casete de unión a ATP, subfamilia D, miembro 1 (ABCD1); en el que el vector no comprende un elemento regulador postranscripcional de marmota (WPRE).

- 40 En diversos ejemplos determinados, la presente divulgación contempla, en parte, un vector que comprende: al menos una LTR; un cPPT/FLAP; un RRE; un promotor MND unido operativamente a un polinucleótido que codifica para un polipéptido de ABCD1 humano; y una secuencia de poliadenilación; en el que el vector no comprende un elemento regulador postranscripcional de marmota (WPRE).

- 45 En diversos ejemplos adicionales, la presente divulgación contempla, en parte, un vector que comprende: al menos una LTR de VIH-1 de SIN; una señal de empaquetamiento Psi ( $\Psi$ ); un cPPT/FLAP; un RRE; un promotor MND, unido operativamente a un ADNc que codifica para un polipéptido de ABCD1 humano; y una secuencia de poliadenilación de  $\beta$ -globina de conejo, en el que el vector no comprende un elemento regulador postranscripcional de marmota (WPRE).

- 50 En diversas realizaciones, la presente invención contempla, en parte, una célula huésped transducida con el vector, en el que la célula huésped es una célula madre somática, una célula progenitora, o una célula madre hematopoyética, en la que la célula no es una célula madre embrionaria humana.

En realizaciones particulares, la presente invención contempla además, en parte, los vectores lentivirales de la invención para su uso en terapia génica, en los que la terapia génica trata o previene la adrenoleucodistrofia o adrenomieloparálisis.

- 5 En diversas otras realizaciones, la presente invención contempla, en parte, una célula madre hematopoyética o progenitora transducida con un vector de la invención para su uso en un método de tratamiento de adrenoleucodistrofia o adrenomieloparálisis.

En determinadas realizaciones, la célula es una célula madre hematopoyética.

**Breve descripción de los identificadores de secuencia**

SEQ ID NO: 1 es una secuencia de ADNc que codifica para ABCD1 humano.

- 10 SEQ ID NO: 2 es una secuencia de ADNc que codifica para ABCD1 humano.

SEQ ID NO: 3 es una secuencia de polinucleótido de promotor MND.

**Breve descripción de las varias vistas de los dibujos**

- 15 La figura 1 muestra un mapa esquemático de constructos del vector de MND-ALD usados en estudios preclínicos y clínicos. Todos los vectores tienen el ADNc de ABCD-1 humano bajo el control del promotor MND para la expresión de alto nivel. Las modificaciones de seguridad a pLBP100 y pLBP140 incluyen: 2 codones de terminación en la región codificante gag, una delección de 400 pb en U3 de la LTR de VIH derecha y la señal de poliA de  $\beta$ -globina de conejo (r $\beta$ gppA). LTR de VIH, repetición terminal larga del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1;  $\Psi^+$ , señal de empaquetamiento; cPPT/fragmento, tramo de polipurina central; RRE, elemento de respuesta rev; ppt, tramo de polipurina. El vector pLBP140 difiere del vector pLBP100 en la introducción del elemento regulador posttranscripcional del virus de la hepatitis de marmota mutado (mut6) pero funcional ( $\Delta$ WPRE).
- 20

La figura 2 muestra transducción con los vectores lentivirales pLBP100 y pLBP140 y cultivos de líquidos y metilcelulosa a corto plazo en experimentos.

La figura 3 muestra transducción con los vectores lentivirales pLBP100 y pLBP140 seguido por cultivos de líquidos y metilcelulosa a corto plazo o cultivo a largo plazo sobre estromas MS5 de soporte.

- 25 La figura 4 muestra el número de progenitores mieloides (UFC-GM; figura 4A) y eritroides (BFU-E; figura 4B) tras la transducción de células CD34+ humanas normales. Se realizaron transducciones usando o bien pLBP100 (p100) o bien pLBP140 (p140) lo que implica cuatro experimentos separados.

- 30 La figura 5 muestra la frecuencia de LTC-IC. Tras la dilución limitante y el cultivo conjunto estromal de 5 semanas con transferencia a cultivos de metilcelulosa para la enumeración de CFC secundarios y la estimación de frecuencias con intervalos de confianza del 95% usando el programa L-Calcul™.

La figura 6 muestra la eficacia de la integración de vectores en progenitores a corto plazo. (A) Número de copias del vector (VCN) sobre células a los 7, 14, 28, 31 y 35 días en cultivo líquido. (B) VCN promedio de cultivos de CFC de 14 días agrupados. (C) Porcentaje de colonias mieloides positivas para el vector. Se indican los números de colonias positivas totales analizadas.

- 35 La figura 7 muestra la eficacia de la integración de vectores en progenitores a corto plazo frente a largo plazo (LTC-IC). (A) VCN promedio de cultivos de CFC de 14 días agrupados. (B) Porcentaje de colonias mieloides positivas para el vector. Se indican los números de colonias positivas y totales analizadas.

- 40 La figura 8 muestra la expresión de proteína de ALD (ALDP) en células transducidas mediante citometría de flujo. (A1 y A2) Histogramas que muestran fluorescencia de PE para células transducidas simuladas, pLBP100 y pLBP140 de diferentes experimentos. (B) Porcentaje de células ALDP positivas a los 7 días (expts. 072010 y 091410), 14 días (expt. 081010) y 28 días (expt. 080610). (C) MFI como una relación sobre los controles simulados que muestran niveles relativos de expresión de ALDP entre las células ALDP +.

- 45 La figura 9 muestra un mapa esquemático de un constructo del vector de MND-ALD. El vector tiene el ADNc de ABCD-1 humano bajo el control del promotor MND para la expresión de alto nivel. LTR de VIH, repetición terminal larga del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1;  $\Psi^+$ , señal de empaquetamiento; cPPT/fragmento, tramo de polipurina central; RRE, elemento de respuesta rev; ppt, tramo de polipurina. El vector no contiene una secuencia de WPRE.

La figura 10 muestra la relación de la corrección de VLCFA a simulado frente a VCN en 4496 células transducidas con p100 y p140 a diversas MOI.

- 50 **Descripción detallada**

## A. Visión general

La presente invención se refiere generalmente a vectores virales y terapias de células transducidas más seguras y más eficaces para adrenoleucodistrofias y adrenomieloneuropatías. Sin querer limitarse a ninguna teoría particular, los solicitantes contemplan que las células madre hematopoyéticas de niños varones con ALD son de otro modo normales y dado que las microglías son de origen de médula ósea, la complementación del gen de ABCD1 defectuoso con el ADNc de ABCD1 normal en las células madre hematopoyéticas de los sujetos podría conducir a normalización de niveles de ALDP en la microglía cerebral. Por tanto, la transferencia génica *ex vivo* del ADNc de ABCD1 normal en células madre hematopoyéticas CD34+ autólogas usando vectores de la presente invención, seguido por trasplante tras ablación de médula ósea, puede dar como resultado la estabilización de la función del SNC y una caída en los niveles de VLCFA plasmáticos asociados con los efectos mortales de ALD.

Por consiguiente, las composiciones y los métodos de la presente invención podrían representar un avance médico significativo en el tratamiento de niños con ALD, puesto que permitirá un rápido tratamiento con un riesgo significativamente disminuido de incorporación hematopoyética del fallo de injerto y eliminación de GvHD aguda y crónica. El tiempo es básicamente la esencia en esta población debido al potencial de rápido deterioro del SNC y la espera de 12-18 meses antes de observarse estabilización de la enfermedad con HCT.

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique específicamente lo contrario, métodos convencionales de biología molecular y técnicas de ADN recombinante dentro de la experiencia en la técnica, muchos de los cuales se describen a continuación con el fin de ilustración. Tales técnicas se explican totalmente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Sambrook, *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª edición, 1989); Maniatis *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982); ADN Cloning: A Practical Approach, vol. I & II (D. Glover, ed.); Oligonucleotide Synthesis (N. Gait, ed., 1984); Nucleic Acid Hybridization (B. Hames & S. Higgins, eds., 1985); Transcription and Translation (B. Hames & S. Higgins, eds., 1984); Animal Cell Culture (R. Freshney, ed., 1986); A Practical Guide to Molecular Cloning (B. Perbal, ed., 1984).

## B. Definiciones

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entienden comúnmente los expertos habituales en la técnica a la que pertenece la invención. Para los fines de la presente invención, los siguientes términos se definen a continuación.

Tal como se usa en el presente documento, el término "retrovirus" se refiere a un virus de ARN que transcribe de manera inversa su ARN genómico en una copia de ADN bicatenario lineal y posteriormente, integra de manera covalente su ADN genómico en un genoma del huésped. Los retrovirus pertenecen a la familia *Retroviridae*, que se compone de numerosos virus encapsulados, no icosaédricos que poseen dos copias de un genoma de ARN monocatenario que tiene una región dimerizada corta. Los retrovirus son una herramienta común para la inserción de genes (Miller, 2000, Nature. 357: 455-460). Una vez se integra el virus en el genoma del huésped, se denomina "provirus." El provirus sirve como un molde para ARN polimerasa II y dirige la expresión de moléculas de ARN que codifican para las proteínas estructurales y enzimas necesarias para producir nuevas partículas virales.

Los retrovirus ilustrativos incluyen, pero no se limitan a: virus de leucemia murina de Moloney (M-MuLV), virus del sarcoma murino de Moloney (MoMSV), virus del sarcoma murino de Harvey (HaMuSV), virus de tumor de mama murino (MuMTV), virus de leucemia de simio del gibón (GaLV), virus de leucemia felina (FLV), espumavirus, virus de leucemia murina de Friend, virus de células madre murinas (MSCV) y virus del sarcoma de Rous (RSV) y lentivirus.

Tal como se usa en el presente documento, el término "lentivirus" se refiere a un grupo (o género) de retrovirus complejos. Los retrovirus ilustrativos incluyen, pero no se limitan a: VIH (virus de la inmunodeficiencia humana; incluyendo VIH tipo 1, y VIH tipo 2); virus de Visna-Maedi (VMV); el virus de artritis-encefalitis caprina (CAEV); virus de anemia infecciosa equina (EIAV); virus de la inmunodeficiencia felina (FIV); virus de la inmunodeficiencia bovina (BIV); y virus de la inmunodeficiencia de simio (SIV). En una realización, se prefieren estructuras principales de vector basadas en VIH (es decir, elementos de secuencia que actúan en *cis* de VIH).

Pueden usarse vectores retrovirales y más particularmente vectores lentivirales en la práctica de la presente invención. Por consiguiente, el término "retrovirus" o "vector retroviral", tal como se usa en el presente documento se pretende que incluya "lentivirus" y "vectores lentivirales" respectivamente.

El término "vector" se usa en el presente documento para referirse a una molécula de ácido nucleico que puede transferir o transportar otra molécula de ácido nucleico. El ácido nucleico transferido se une generalmente a, por ejemplo, se inserta en, la molécula de ácido nucleico del vector. Un vector puede incluir secuencias que dirigen la replicación autónoma en una célula, o puede incluir secuencias suficientes para permitir la integración en ADN de célula huésped. Los vectores útiles incluyen, por ejemplo, plásmidos (por ejemplo, plásmidos de ADN o plásmidos de ARN), cósmidos, cromosomas artificiales bacterianos y vectores virales. Los vectores virales útiles incluyen, por ejemplo, retrovirus y lentivirus de replicación defectuosa.

Tal como será evidente para un experto en la técnica, el término "vector viral" se usa ampliamente para referirse o bien a una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, un plásmido de transferencia) que incluye elementos de ácido

nucleico derivados de virus que normalmente facilitan la transferencia de la molécula de ácido nucleico o integración en el genoma de una célula o bien a una partícula viral que media en la transferencia de ácidos nucleicos. Las partículas virales incluirán normalmente diversos componentes virales y a veces también componentes de células huésped además de ácido(s) nucleico(s).

5 El término vector viral puede referirse o bien a un virus o partícula viral que puede transferir un ácido nucleico en una célula o al ácido nucleico transferido en sí. Los vectores virales y plásmidos de transferencia contienen elementos genéticos estructurales y/o funcionales que se derivan principalmente de un virus. El término "vector retroviral" se refiere a un vector viral o plásmido que contiene elementos genéticos estructurales y funcionales que se derivan principalmente de un retrovirus. El término "vector lentiviral" se refiere a un vector viral o plásmido que contiene elementos genéticos estructurales y funcionales, incluyendo LTR que se derivan principalmente de un lentivirus. El término "híbrido" se refiere a un vector, LTR u otro ácido nucleico que contiene tanto secuencias retrovirales, por ejemplo, lentivirales, como secuencias virales no lentivirales. Un vector híbrido puede referirse a un vector o plásmido de transferencia que comprende secuencias retrovirales por ejemplo, lentivirales, para transcripción inversa, replicación, integración y/o empaquetamiento y secuencias promotoras subgenómicas de alfavirus, proteínas no estructurales y/o sitios de reconocimiento de polimerasa.

10 En realizaciones particulares, los términos "vector lentiviral", "vector de expresión lentiviral" pueden usarse para referirse a plásmidos de transferencia lentivirales y/o partículas lentivirales infecciosas. Cuando se hace referencia en el presente documento a elementos tales como sitios de clonación, promotores, elementos reguladores, ácidos nucleicos heterólogos, etc., debe entenderse que las secuencias de estos elementos están presentes en forma de ARN en las partículas lentivirales de la invención y están presentes en forma de ADN en los plásmidos de ADN de la invención.

15 En cada extremo del provirus hay estructuras denominadas "repeticiones terminales largas" o "LTR." El término "repetición terminal larga (LTR)" se refiere a dominios de pares de bases ubicados en los extremos de ADN retrovirales que, en su contexto de secuencia natural, son repeticiones directas y contienen regiones U3, R y U5. Las LTR proporcionan generalmente funciones fundamentales para la expresión de genes retrovirales (por ejemplo, promoción, iniciación y poliadenilación de transcritos génicos) y para replicación viral. La LTR contiene numerosas señales reguladoras que incluyen elementos de control de la transcripción, señales de poliadenilación y secuencias necesarias para la replicación e integración del genoma viral. La LTR viral se divide en tres regiones denominadas U3, R y U5. La región U3 contiene los elementos potenciadores y promotores. La región U5 es la secuencia entre el sitio de unión a cebador y la región R y contiene la secuencia de poliadenilación. La región R (repetición) está flanqueada por las regiones U3 y U5. La LTR que se compone de regiones U3, R y U5, aparece tanto en el extremo 5' como 3' del genoma viral. Adyacente a la LTR 5' hay secuencias necesarias para la transcripción inversa del genoma (el sitio de unión a cebador de ARNt) y para el empaquetamiento eficaz de ARN viral en partículas (el sitio de Psi).

25 Tal como se usa en el presente documento, el término "señal de empaquetamiento" o "secuencia de empaquetamiento" se refiere a secuencias ubicadas dentro del genoma retroviral que se requieren para la inserción del ARN viral en la partícula o cápside viral, véase por ejemplo, Clever *et al.*, 1995. J. de Virology, vol. 69, n.º 4; págs. 2101-2109. Varios vectores retrovirales usan la señal de empaquetamiento mínima (también denominada secuencia psi [ $\Psi$ ]) necesaria para la encapsidación del genoma viral. Por tanto, tal como se usa en el presente documento, los términos "secuencia de empaquetamiento", "señal de empaquetamiento", "psi" y el símbolo " $\Psi$ ", se usan en referencia a la secuencia no codificante requerida para encapsidación de hebras de ARN retroviral durante la formación de partículas virales.

30 En diversas realizaciones, los vectores comprenden LTR 5' y/o LTR 3' modificadas. Las modificaciones de la LTR 3' se realizan a menudo para mejorar la seguridad de sistemas lentivirales o retrovirales volviendo la replicación de virus defectuosa. Tal como se usa en el presente documento, el término "replicación defectuosa" se refiere a un virus que no puede realizar replicación completa y eficaz de modo que no se producen viriones infecciosos (por ejemplo, progenie lentiviral de replicación defectuosa). El término "replicación competente" se refiere a un virus silvestre o virus mutante que puede realizar replicación, de modo que la replicación viral del virus puede producir viriones infecciosos (por ejemplo, progenie lentiviral de replicación competente).

35 Vectores de "autoinactivación" (SIN) se refiere a vectores de replicación defectuosa, por ejemplo, vectores retrovirales o lentivirales, en los que la región de potenciador-promotor de LTR derecha (3'), conocida como la región U3, se ha modificado (por ejemplo, mediante delección o sustitución) para evitar la transcripción viral más allá de la primera ronda de replicación viral. Esto es porque se usa la región U3 de LTR derecha (3') como molde para la región U3 de LTR izquierda (5') durante replicación viral y, por tanto, el transcrito viral no puede elaborarse sin el potenciador-promotor U3. En una realización adicional de la invención, la LTR 3' se modifica de modo que la región U5 se reemplaza, por ejemplo, con una secuencia de poli(A) ideal. Debe indicarse que también se incluyen modificaciones a las LTR tales como modificaciones a la LTR 3', la LTR 5', o tanto la LTR 3' como 5', en la invención.

40 Se proporciona un potenciamiento de seguridad adicional reemplazando la región U3 de la LTR 5' con un promotor heterólogo para conducir la transcripción del genoma viral durante la producción de partículas virales. Los ejemplos

de promotores heterólogos que pueden usarse incluyen, por ejemplo, promotores de virus de simio viral 40 (SV40) (por ejemplo, temprano o tardío), citomegalovirus (CMV) (por ejemplo, inmediatamente temprano), virus de leucemia murina de Moloney (MoMLV), virus del sarcoma de Rous (RSV) y virus del herpes simple (HSV) (timidina cinasa). Los promotores típicos pueden activar altos niveles de transcripción de una manera independiente de Tat. Este reemplazo reduce la posibilidad de recombinación para generar virus de replicación competente porque no hay secuencia de U3 completa en el sistema de producción de virus.

En algunas realizaciones, los vectores virales comprenden un elemento TAR. El término "TAR" se refiere al elemento genético de "respuesta de transactivación" ubicado en la región R de LTR lentivirales (por ejemplo, VIH). Este elemento interactúa con el elemento genético transactivador lentiviral (tat) para potenciar la replicación viral. Sin embargo, este elemento no se requiere en realizaciones en las que la región U3 de la LTR 5' se reemplaza por un promotor heterólogo.

La "región R" se refiere a la región dentro de LTR retrovirales que empiezan en el inicio del grupo de encapsulación (es decir, el inicio de la transcripción) y que terminan inmediatamente antes del inicio del tramo de poli A. La región R también se define como que está flanqueada por las regiones U3 y U5. La región R desempeña un papel durante la transcripción inversa para permitir la transferencia de ADN naciente desde un extremo del genoma hasta el otro.

Tal como se usa en el presente documento, el término "elemento FLAP" se refiere a un ácido nucleico cuya secuencia incluye el tramo de polipurina central y secuencias de terminación centrales (cPPT y CTS) de un retrovirus, por ejemplo, VIH-1 o VIH-2. Se describen elementos FLAP adecuados en la patente estadounidense n.º 6.682.907 y en Zennou, *et al.*, 2000, Cell, 101:173. Durante la transcripción inversa de VIH-1, la iniciación central del ADN de hebra positiva en el tramo de polipurina central (cPPT) y la terminación central en la secuencia de terminación central (CTS) conducen a la formación de una estructura de ADN de tres hebras: el fragmento de ADN central de VIH-1. Sin querer limitarse a ninguna teoría, el fragmento de ADN puede actuar como un determinante cis-activo de la importación nuclear del genoma lentiviral y/o puede aumentar el título del virus. En realizaciones particulares, las estructuras principales del vector lentiviral comprenden uno o más elementos FLAP en 5' o en 3' de los genes heterólogos de interés en los vectores. Por ejemplo, en realizaciones particulares, un plásmido de transferencia incluye un elemento FLAP. En una realización, un vector de la invención comprende un elemento FLAP aislado de VIH-1.

En una realización, los vectores de transferencia lentivirales comprenden uno o más elementos de exportación. El término "elemento de exportación" se refiere a un elemento regulador postranscripcional que actúa en cis que regula el transporte de un transcrito de ARN desde el núcleo hasta el citoplasma de una célula. Los ejemplos de elementos de ARN de exportación incluyen, pero no se limitan a, el elemento de respuesta rev (RRE) del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (véase, por ejemplo, Cullen *et al.*, 1991, J. Virol. 65: 1053; y Cullen *et al.*, 1991, Cell 58: 423), y el elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis B (HPRE). Generalmente, el elemento de exportación de ARN se coloca dentro de la UTR 3' de un gen, y puede insertarse como una o múltiples copias.

La expresión de secuencias heterólogas en vectores virales puede aumentarse incorporando elementos reguladores postranscripcionales, y sitios de poliadenilación eficaces y opcionalmente, señales de terminación de la transcripción en los vectores. Una variedad de elementos reguladores postranscripcionales puede aumentar la expresión de un ácido nucleico heterólogo en la proteína, por ejemplo, elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de marmota (WPRE; Zufferey *et al.*, 1999, J. Virol., 73:2886); el elemento regulador postranscripcional presente en el virus de la hepatitis B (HPRE) (Huang *et al.*, Mol. Cell. Biol., 5:3864); y similares (Liu *et al.*, 1995, Genes Dev., 9:1766). El elemento regulador postranscripcional está ubicado generalmente en el extremo 3' de la secuencia heteróloga de ácido nucleico. Esta configuración da como resultado la síntesis de un transcrito de ARNm cuya porción 5' comprende las secuencias codificantes de ácido nucleico heterólogas y cuya porción 3' comprende la secuencia de elemento regulador postranscripcional. En realizaciones preferidas, los vectores de la invención carecen de o no comprenden un elemento regulador postranscripcional tal como un WPRE o HPRE porque, en algunos casos, estos elementos aumentan el riesgo de transformación celular y/o no aumentan sustancialmente o significativamente la cantidad de transcrito de ARNm o aumentan la estabilidad de ARNm. Por tanto, en algunas realizaciones, los vectores de la invención carecen de o no comprenden un WPRE o HPRE como medida de seguridad adicional.

Los elementos que dirigen la terminación y poliadenilación eficaces de los transcritos de ácidos nucleicos heterólogos aumentan la expresión génica heteróloga. Las señales de terminación de la transcripción se encuentran generalmente aguas abajo de la señal de poliadenilación. El término "sitio de poliA" o "secuencia de poliA" tal como se usa en el presente documento denota una secuencia de ADN que dirige tanto la terminación como poliadenilación del transcrito de ARN naciente mediante ARN polimerasa II. La poliadenilación eficaz del transcrito recombinante es deseable ya que los transcritos que carecen de una cola de poli A son inestables y se degradan rápidamente. Los ejemplos ilustrativos de señales de poliA, incluyen una secuencia de poliA ideal (por ejemplo, AATAAA, ATTTAA, AGTAAA), una secuencia de poliA de hormona de crecimiento bovino (BGHPA), una secuencia de poliA de  $\beta$ -globina de conejo ( $\beta$ gpa) u otra secuencia de poliA heteróloga o endógena adecuada conocida en la técnica.

En determinadas realizaciones, un vector lentiviral comprende además un elemento aislante. Los elementos aislantes pueden contribuir a proteger secuencias expresadas por lentivirus, por ejemplo, polipéptidos terapéuticos,



de efectos de sitio de integración, que pueden mediarse mediante elementos que actúan en cis presentes en ADN genómico y conducir a expresión desregulada de secuencias transferidas (es decir, efecto de posición; véase, por ejemplo, Burgess-Beusse *et al.*, 2002, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 99:16433; y Zhan *et al.*, 2001, Hum. Genet., 109:471). En algunas realizaciones, los vectores de transferencia comprenden un elemento aislante en una o ambas LTR o en cualquier parte en la región del vector que se integra en el genoma celular. Los aislantes adecuados para su uso en la invención incluyen, pero no se limitan a, el aislante de  $\beta$ -globina de pollo (véase Chung *et al.*, 1993, Cell 74:505; Chung *et al.*, 1997, PNAS 94:575; y Bell *et al.*, 1999, Cell 98:387). Los ejemplos de elementos aislantes incluyen, pero no se limitan a, un aislante de un locus de  $\beta$ -globina, tal como HS4 de pollo.

Según determinadas realizaciones específicas de la invención, la mayoría o todas las secuencias de estructura principal viral del vector se derivan de un lentivirus, por ejemplo, VIH-1. Sin embargo, debe entenderse que pueden usarse muchas fuentes diferentes de secuencias lentivirales, y numerosas sustituciones y alteraciones en determinadas de las secuencias lentivirales pueden acomodarse sin alterar la capacidad de un vector de transferencia de realizar las funciones descritas en el presente documento. Además, se conoce una variedad de vectores lentivirales en la técnica, véase Naldini *et al.*, (1996a, 1996b, y 1998); Zufferey *et al.*, (1997); Dull *et al.*, 1998, patentes estadounidenses n.ºs 6.013.516; y 5.994.136, cualquiera de las cuales puede adaptarse para producir un vector viral o plásmido de transferencia de la presente invención.

Tal como se usa en el presente documento, los términos “polinucleótido” o “ácido nucleico” se refieren a ARN mensajero (ARNm), ARN, ARN genómico (ARNg), ARN de hebra + (ARN(+)), ARN de hebra - (ARN(-)), ADN genómico (ADNg), ADN complementario (ADNc) o ADN. Los polinucleótidos incluyen polinucleótidos mono y bicatenarios. Preferiblemente, los polinucleótidos de la invención incluyen polinucleótidos o variantes que tienen al menos aproximadamente el 50%, el 55%, el 60%, el 65%, el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o el 100% de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de referencia descritas en el presente documento (véase, por ejemplo, la lista de secuencias), normalmente cuando la variante mantiene al menos una actividad biológica de la secuencia de referencia. En diversas realizaciones ilustrativas, la presente invención contempla, en parte, secuencias de polinucleótido de vector viral y plásmido de transferencia y composiciones que las comprenden. En realizaciones particulares, la invención proporciona polinucleótidos que codifican para polipéptidos terapéuticos.

Tal como se usa en el presente documento, los términos “variante de polinucleótido” y “variante” y similares, se refieren a polinucleótidos que presentan identidad de secuencia sustancial con una secuencia de polinucleótido de referencia o polinucleótidos que se hibridan con una secuencia de referencia en condiciones rigurosas que se definen a continuación en el presente documento. Estos términos incluyen polinucleótidos en los que uno o más nucleótidos se han añadido o delecionado, o reemplazado con diferentes nucleótidos en comparación con un polinucleótido de referencia. En este aspecto, se entiende bien en la técnica que determinadas alteraciones que incluyen mutaciones, adiciones, delecciones y sustituciones pueden realizarse a un polinucleótido de referencia mediante lo cual el polinucleótido alterado conserva la función o actividad biológica del polinucleótido de referencia.

Tal como se usa en el presente documento, el término “aislado” significa un material que está sustancialmente o esencialmente libre de componentes que lo acompañan normalmente en su estado nativo. Por ejemplo, un “polinucleótido aislado”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un polinucleótido que se ha purificado a partir de las secuencias que lo flanquean en un estado que se produce de manera natural, por ejemplo, un fragmento de ADN que se ha retirado de las secuencias que son normalmente adyacentes al fragmento.

Los términos que describen la orientación de los polinucleótidos incluyen: 5' (normalmente el extremo del polinucleótido que tiene un grupo fosfato libre) y 3' (normalmente el extremo del polinucleótido que tiene un grupo hidroxilo libre (OH)). Las secuencias de polinucleótido pueden anotarse en la orientación 5' a 3' o en la orientación 3' a 5'.

Los términos “complementario” y “complementariedad” se refieren a polinucleótidos (es decir, una secuencia de nucleótidos) relacionados por las normas de apareamiento de bases. Por ejemplo, la hebra complementaria de la secuencia de ADN 5' A G T C A T G 3' es 3' T C A G T A C 5'. La última secuencia se escribe a menudo como el complemento inverso con el extremo 5' a la izquierda y el extremo 3' a la derecha, 5' C A T G A C T 3'. Una secuencia que es igual a su complemento inverso se dice que es una secuencia palindrómica. La complementariedad puede ser “parcial”, en la que sólo algunos de las bases de ácidos nucleicos se emparejan según las normas de apareamiento de bases. O, puede haber complementariedad “completa” o “total” entre los ácidos nucleicos.

El término “casete de ácido nucleico” tal como se usa en el presente documento se refiere a secuencias genéticas dentro del vector que pueden expresar un ARN, y posteriormente, una proteína. El casete de ácido nucleico contiene el gen de interés. El casete de ácido nucleico está orientado de manera posicional y secuencial dentro del vector de modo que el ácido nucleico en el casete puede transcribirse en ARN, y cuando sea necesario, traducirse en una proteína o un polipéptido, experimentar modificaciones postraduccionales apropiadas requeridas para la actividad en la célula transformada, y translocarse al compartimento adecuado para la actividad biológica mediante direccionamiento a compartimentos intracelulares apropiados o secreción en compartimentos extracelulares. Preferiblemente, el casete tiene sus extremos 3' y 5' adaptados para inserción fácil en un vector, por ejemplo, tiene

sitios de endonucleasa de restricción en cada extremo. En una realización preferida de la invención, el casete de ácido nucleico contiene la secuencia de un gen terapéutico usado para tratar la adrenoleucodistrofia o la adrenomieloneuropatía. El casete puede retirarse e insertarse en un vector plasmídico o viral como una única unidad.

5 Los polinucleótidos incluyen un polinucleótido de interés. Tal como se usa en el presente documento, el término “polinucleótido de interés” se refiere al polinucleótido, por ejemplo, un polinucleótido que codifica para un polipéptido (es decir, un polipéptido de interés), insertado en un vector de expresión que se desea expresar. En determinadas realizaciones, el polinucleótido de interés codifica para un polipéptido que proporciona un efecto terapéutico en el tratamiento o la prevención de una enfermedad o trastorno, que puede denominarse “polipéptido terapéutico”, por ejemplo, gen de casete de unión a ATP, subfamilia D (ALD), miembro 1 (ABCD1). Los polinucleótidos de interés, y polipéptidos codificados de los mismos, incluyen tanto polinucleótidos que codifican para polipéptidos silvestres, así como variantes funcionales y fragmentos de los mismos. En realizaciones particulares, una variante funcional tiene al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95% o al menos el 99% de identidad con un polinucleótido de referencia silvestre correspondiente o secuencia de polipéptido. En determinadas realizaciones, una variante funcional o fragmento tiene al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80% o al menos el 90% de una actividad biológica de un polipéptido silvestre correspondiente. Las secuencias de polinucleótidos representativas adecuadas para su uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, los ADNc de ACBD1 humanos expuestos en SEQ ID NO: 1-2.

20 Los polinucleótidos de la presente invención, independientemente de la longitud de la secuencia codificante en sí, pueden combinarse con otras secuencias de ADN, tales como promotores y/o potenciadores, regiones no traducidas (UTR), secuencias de Kozak, señales de poliadenilación, sitios de enzimas de restricción adicionales, sitios de clonación múltiples, sitios de entrada ribosómicos internos (IRES), sitios de reconocimiento de recombinasa (por ejemplo, sitios LoxP, FRT y Att), codones de terminación, señales de terminación de la transcripción y polinucleótidos que codifican para polipéptidos de autoescisión, marcadores de epítomos, tal como se da a conocer en cualquier parte en el presente documento o tal como se conoce en la técnica, de modo que su longitud global puede variar considerablemente. Por tanto, se contempla que un fragmento de polinucleótido de casi cualquier longitud pueda emplearse, limitándose la longitud total preferiblemente por la facilidad de preparación y uso en el protocolo de ADN recombinante previsto.

30 El término “promotor” tal como se usa en el presente documento se refiere a un sitio de reconocimiento de un polinucleótido (ADN o ARN) al que se une ARN polimerasa. El término “potenciador” se refiere a un segmento de ADN que contiene secuencias que pueden proporcionar transcripción potenciada y en algunos casos pueden funcionar de manera independiente a su orientación en relación con otra secuencia de control. Un potenciador puede funcionar de manera cooperativa o aditiva con promotores y/u otros elementos potenciadores. El término “promotor/potenciador” se refiere a un segmento de ADN que contiene secuencias que pueden proporcionar tanto funciones de promotor como de potenciador. En una realización, un vector de la invención comprende un promotor con sitio de unión a cebador dl587rev sustituido, con región de control negativo delecionada, potenciador del virus del sarcoma mieloproliferativo (MND) (Challita *et al.*, J Virol. 69(2):748-55 (1995); SEQ ID NO: 3).

40 En realizaciones particulares, un vector de la invención comprende secuencias de control exógenas, endógenas o heterólogas tales como promotores y/o potenciadores. Una secuencia de control “endógena” es una que está unida de manera natural con un gen dado en el genoma. Una secuencia de control “exógena” es una que se coloca en yuxtaposición a un gen mediante manipulación genética (es decir, técnicas de biología molecular) de modo que la transcripción de ese gen está dirigida por el potenciador/promotor unido. Una secuencia de control “heteróloga” es una secuencia exógena que es de una especie diferente a la célula que se está manipulando genéticamente.

45 El término “unido operativamente”, se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes descritos están en una relación que los permite funcionar de su manera prevista. En una realización, el término se refiere a una unión funcional entre una secuencia de control de la expresión de ácidos nucleicos (tal como un promotor, y/o potenciador) y una segunda secuencia de polinucleótido, por ejemplo, un polinucleótido de interés, en el que la secuencia de control de la expresión dirige la transcripción del ácido nucleico correspondiente a la segunda secuencia.

50 Tal como se usa en el presente documento, el término “promotor constitutivo” se refiere a un promotor que sigue de manera constante o continua la transcripción de una secuencia unida operativamente. Los promotores constitutivos pueden ser un “promotor ubicuo” que permite la expresión en una amplia variedad de tipos celulares y tisulares o un “promotor específico de tejido” que permite la expresión en una variedad limitada de tipos celulares y tisulares. Los promotores ubicuos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, un promotor temprano inmediato de citomegalovirus (CMV), un virus de simio viral 40 (SV40) (por ejemplo, temprano o tardío), un promotor de LTR de virus de leucemia murina de Moloney (MoMLV), una LTR de virus del sarcoma de Rous (RSV), un promotor de virus del herpes simple (HSV) (timidina cinasa), promotores de H5, P7.5 y P11 de virus vaccinia, un promotor de factor de elongación 1-alfa (EF1a), respuesta de crecimiento temprana 1 (EGR1), ferritina H (FerH), ferritina L (FerL), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), factor de iniciación de la traducción eucariota 4A1 (EIF4A1), proteína 5 de choque térmico de 70 kDa (HSPA5), proteína  $\beta$  de 90 kDa de choque térmico, miembro 1 (HSP90B1), proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70),  $\beta$ -cinesina ( $\beta$ -KIN), el locus humano ROSA 26 (Irions *et al.*, Nature Biotechnology 25, 1477 - 1482 (2007)), un promotor de ubiquitina C (UBC), un promotor de fosfoglicerato cinasa-1 (PGK), un promotor

de  $\beta$ -actina de pollo/potenciador de citomegalovirus (CAG) y un promotor de  $\beta$ -actina.

Puede ser deseable usar un promotor específico de tejido para lograr expresión específica del tipo tisular, específica del linaje o específica del tejido de una secuencia deseada de polinucleótido (por ejemplo, para expresar un ácido nucleico particular que codifica para un polipéptido en sólo un subconjunto de tipos celulares o tejidos o durante fases específicas del desarrollo). Los ejemplos ilustrativos de promotores específicos del tejido incluyen, pero no se limitan a: un promotor B29 (expresión de células B), un promotor de factor de transcripción Runt (CBFa2) (expresión específica de células madre), un promotor CD14 (expresión de células monocíticas), un promotor CD43 (expresión de leucocitos y plaquetas), un promotor CD45 (expresión de células hematopoyéticas), un promotor CD68 (expresión de macrófagos), un promotor CYP450 3A4 (expresión de hepatocitos), un promotor de desmina (expresión muscular), un promotor de elastasa 1 (expresión de células acinares pancreáticas), un promotor de endoglin (expresión de células endoteliales), un promotor de proteína 1 específico de fibroblasto (FSP1) (expresión de células de fibroblastos), un promotor de fibronectina (expresión de células de fibroblastos), un promotor de tirosina cinasa relacionado con fms (FLT1) (expresión de células endoteliales), un promotor de proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (expresión de astrocitos), un promotor de insulina (expresión de células beta pancreáticas), un promotor de integrina, alfa 2b (ITGA2B) (megacariocitos), un promotor de molécula 2 de adhesión intracelular (ICAM-2) (células endoteliales), un promotor de interferón beta (IFN- $\beta$ ) (células hematopoyéticas), un promotor de queratina 5 (expresión de queratinocitos), un promotor de mioglobina (MB) (expresión muscular), un promotor de diferenciación miogénica 1 (MYOD1) (expresión muscular), un promotor de nefrina (expresión de podocitos), un promotor de proteína 2 de gamma-carboxiglutamato de hueso (OG-2) (expresión de osteoblastos), un promotor de 3-oxoácido CoA transferasa 2B (Oxct2B), (expresión haploide-espermática), un promotor de proteína B tensioactiva (SP-B) (expresión pulmonar), un promotor de sinapsina (expresión neuronal), un promotor de proteína del síndrome de Wiskott-Aldrich (WASP) (expresión de células hematopoyéticas).

En una realización, un vector de la presente invención comprende un promotor y/o potenciador específico de tejido que expresa un polipéptido deseado, por ejemplo, ABCD1, en células microgliales, por ejemplo, un promotor MND (SEQ ID NO: 3).

Tal como se usa en el presente documento, "expresión condicional" puede referirse a cualquier tipo de expresión condicional que incluye, pero no se limita a, expresión inducible; expresión reprimible; expresión en células o tejidos que tienen un estado fisiológico, biológico o patológico particular, etc. Esta definición no se pretende que excluya la expresión específica del tipo celular o del tejido. Determinadas realizaciones de la invención proporcionan expresión condicional de un polinucleótido de interés, por ejemplo, la expresión se controla sometiendo una célula, tejido, organismo, etc., a un tratamiento o condición que provoca que el polinucleótido se exprese o que provoca un aumento o disminución en la expresión del polinucleótido codificado por el polinucleótido de interés.

Los ejemplos ilustrativos de promotores/sistemas inducibles incluyen, pero no se limitan a, promotores inducibles por esteroides tales como promotores para genes que codifican receptores de glucocorticoides o estrógenos (inducibles mediante tratamiento con la hormona correspondiente), promotor de metalotionina (inducible mediante tratamiento con diversos metales pesados), promotor MX-1 (inducible mediante interferón), el sistema regulable por mifepristona "GeneSwitch" (Sirin *et al.*, 2003, *Gene*, 323:67), los sistemas reguladores dependientes de tetraciclina Cumate GeneSwitch inducibles (documento WO 2002/088346), etc.

También puede lograrse expresión condicional usando una ADN recombinasa específica del sitio. Según determinados ejemplos de la divulgación, el vector comprende al menos uno (normalmente dos) sitio(s) para recombinación mediada por una recombinasa específica del sitio. Tal como se usa en el presente documento, los términos "recombinasa" o "recombinasa específica del sitio" incluyen proteínas excisivas o integradoras, enzimas, cofactores o proteínas asociadas que están implicadas en reacciones de recombinación que implican uno o más sitios de recombinación (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, siete, diez, doce, quince, veinte, treinta, cincuenta, etc.), que pueden ser proteínas silvestres (véase Landy, *Current Opinion in Biotechnology* 3:699-707 (1993)), o mutantes, derivados (por ejemplo, proteínas de fusión que contienen las secuencias de proteínas de recombinación o fragmentos de las mismas), fragmentos, y variantes de las mismas. Los ejemplos ilustrativos de recombinasas adecuadas para su uso en ejemplos particulares de la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a: Cre, Int, IHF, Xis, FIp, Fis, Hin, Gin,  $\Phi$ C31, Cin, Tn3 resolvasa, TndX, XerC, XerD, TnpX, Hjc, Gin, SpCCE1 y ParA.

Los vectores pueden comprender uno o más sitios de recombinación para cualquiera de una amplia variedad de recombinasas específicas del sitio. Debe entenderse que el sitio diana para una recombinasa específica del sitio se requiere además de cualquier sitio(s) para la integración de un vector, por ejemplo, un vector retroviral o vector lentiviral. Tal como se usa en el presente documento, los términos "secuencia de recombinación", "sitio de recombinación", o "sitio específico de recombinación" se refieren a una secuencia particular de ácido nucleico a la que una recombinasa reconoce y se une.

Por ejemplo, un sitio de recombinación para Cre recombinasa es loxP que es una secuencia de 34 pares de bases que comprende dos repeticiones invertidas de 13 pares de bases (que actúan como los sitios de unión a recombinasa) que flanquean una secuencia núcleo de 8 pares de bases (véase la figura 1 de Sauer, B., *Current Opinion in Biotechnology* 5:521-527 (1994)). Otros sitios de loxP a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a: lox511 (Hoess *et al.*, 1996; Betke y Sauer, 1997), lox5171 (Lee y Saito, 1998), lox2272 (Lee y Saito, 1998), m2

(Langer *et al.*, 2002), lox71 (Albert *et al.*, 1995) y lox66 (Albert *et al.*, 1995).

Los sitios de reconocimiento adecuados para la FLP recombinasa incluyen, pero no se limitan a: FRT (McLeod, *et al.*, 1996), F1, F2, F3 (Schlake y Bode, 1994), F4, F5 (Schlake y Bode, 1994), FRT(LE) (Senecoff *et al.*, 1988), FRT(RE) (Senecoff *et al.*, 1988).

- 5 Otros ejemplos de secuencias de reconocimiento son las secuencias attB, attP, attL y attR, que se reconocen por la enzima recombinasa  $\lambda$  integrasa, por ejemplo, fi-c31. La  $\phi$ 31 SSR media recombinación sólo entre los sitios heterotípicos attB (34 pb de longitud) y attP (39 pb de longitud) (Groth *et al.*, 2000). attB y attP, denominadas por los sitios de unión para la fago integrasa en los genomas bacterianos y de fagos, respectivamente, contienen ambas repeticiones invertidas imperfectas que se unen probablemente mediante homodímeros  $\phi$ C31 (Groth *et al.*, 2000).  
 10 Los sitios de producto, attL y attR, son eficazmente inertes a recombinación mediada por  $\phi$ C31 adicional (Belteki *et al.*, 2003), haciendo que la reacción sea irreversible. Para catalizar inserciones, se ha encontrado que ADN que lleva attB se inserta en un sitio de attP genómico más rápidamente que un sitio de attP en un sitio de attB genómico (Thyagarajan *et al.*, 2001; Belteki *et al.*, 2003). Por tanto, las estrategias típicas posicionan por recombinación homóloga un "sitio de acoplamiento" que lleva attP en un locus definido, que luego se asocia con una secuencia entrante que lleva attB para la inserción.  
 15

Tal como se usa en el presente documento, un "sitio de entrada de ribosomas interno" o "IRES" se refiere a un elemento que promueve la entrada de ribosomas interna directa en el codón de iniciación, tal como ATG, de un cistron (una región codificante de proteínas), conduciendo de ese modo a la traducción independiente de cap del gen. Véase, por ejemplo, Jackson *et al.*, 1990. Trends Biochem Sci 15(12):477-83) y Jackson y Kaminski. 1995. RNA 1(10):985-1000. En realizaciones particulares, los vectores contemplados por la invención, incluyen uno o más polinucleótidos de interés que codifican para uno o más polipéptidos. Para lograr una traducción eficaz de cada una de la pluralidad de polipéptidos, las secuencias de polinucleótido pueden separarse mediante una o más secuencias de IRES o secuencias de polinucleótido que codifican para polipéptidos de autoescisión.  
 20

Tal como se usa en el presente documento, el término "secuencia de Kozak" se refiere a una secuencia corta de nucleótidos que facilita enormemente la unión inicial de ARNm a la pequeña subunidad del ribosoma y aumenta la traducción. La secuencia de Kozak de consenso es (GCC)RCCATGG, donde R es una purina (A o G) (Kozak, 1986. Cell. 44(2):283-92, y Kozak, 1987. Nucleic Acids Res. 15(20):8125-48). En realizaciones particulares, los vectores contemplados por la invención, comprenden polinucleótidos que tienen una secuencia de Kozak de consenso y que codifican para un polipéptido deseado, por ejemplo, ABCD1.  
 25

30 En realizaciones particulares, los vectores comprenden una secuencia de poliadenilación 3' de un polinucleótido que codifica para un polipéptido que va a expresarse. Las secuencias de poliadenilación pueden promover la estabilidad de ARNm mediante la adición de una cola de poliA al extremo 3' de la secuencia codificante y por tanto, contribuir a una eficacia traduccional aumentada. Los sitios de poliadenilación reconocidos incluyen una secuencia de poliA ideal (por ejemplo, AATAAA, ATTAAA AGTAAA), una secuencia de poliA de hormona de crecimiento bovino (BGHPA),  
 35 una secuencia de poliA de  $\beta$ -globina de conejo (r $\beta$ gpA) u otra secuencia de poliA heteróloga o endógena adecuada conocida en la técnica.

En determinadas realizaciones, los vectores comprenden un gen de selección, también denominado marcador seleccionable. Genes de selección típicos que codifican para proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, higromicina, metotrexato, Zeocin, blasticidina o tetraciclina, (b) deficiencias auxotróficas de complemento, o (c) proporcionan nutrientes críticos no disponibles de medios complejos, por ejemplo, el gen que codifica para D-alanina racemasa para Bacilli. Puede usarse cualquier número de sistemas de selección para recuperar líneas celulares transformadas. Estas incluyen, pero no se limitan a, los genes de timidina cinasa de virus del herpes simple (Wigler *et al.*, 1977. Cell 11:223-232) y adenina fosforibosiltransferasa (Lowy *et al.*, 1990. Cell 22:817-823) que pueden emplearse en células tk o aprt, respectivamente.  
 40  
 45

Una "célula huésped" incluye células transfectadas o infectadas *in vivo* o *in vitro* con un vector recombinante o un polinucleótido de la invención. Las células huésped pueden incluir células de empaquetamiento, células productoras y células infectadas con vectores virales. En realizaciones particulares, las células huésped infectadas con vector viral de la invención son para su uso en la administración a un sujeto que necesita terapia.

50 La producción a gran escala de partículas virales a menudo es necesaria para lograr un título viral razonable. Se producen partículas virales transfectando un vector de transferencia en una línea celular de empaquetamiento que comprende genes estructurales y/o accesorios virales, por ejemplo, genes gag, pol, env, tat, rev, vif, vpr, vpu, vpx o nef u otros genes retrovirales.

Tal como se usa en el presente documento, el término "vector de empaquetamiento" se refiere a un vector de expresión o vector viral que carece de una señal de empaquetamiento y comprende un polinucleótido que codifica para uno, dos, tres, cuatro o más genes estructurales y/o accesorios virales. Normalmente, los vectores de empaquetamiento se incluyen en una célula de empaquetamiento, y se introducen en la célula por medio de transfección, transducción o infección. Los métodos para transfección, transducción o infección los conocen bien los  
 55

expertos en la técnica. Un vector de transferencia lentiviral de la presente invención puede introducirse en una línea celular de empaquetamiento, por medio de transfección, transducción o infección, para generar una célula o línea celular productoras. Los vectores de empaquetamiento de la presente invención pueden introducirse en células o líneas celulares humanas mediante métodos convencionales que incluyen, por ejemplo, transfección, lipofección o electroporación de fosfato de calcio. En algunas realizaciones, los vectores de empaquetamiento se introducen en las células junto con un marcador dominante seleccionable, tal como neomicina, higromicina, puromicina, blasticidina, Zeocin, timidina cinasa, DHFR, Gln sintetasa o ADA, seguido por selección en presencia del fármaco apropiado y aislamiento de clones. Un gen marcador seleccionable puede unirse físicamente a genes codificados por el vector de empaquetamiento, por ejemplo, por IRES o péptidos virales de autoescisión.

Las proteínas de la envuelta viral (env) determinan la variedad de células huésped que pueden infectarse en última instancia y transformarse mediante retrovirus recombinantes generados a partir de las líneas celulares. En el caso de lentivirus, tales como VIH-1, VIH-2, SIV, FIV y EIV, las proteínas env incluyen gp41 y gp120. Preferiblemente, las proteínas virales env expresadas por células de empaquetamiento de la invención se codifican en un vector separado de los genes virales gag y pol, tal como se ha descrito previamente.

Los ejemplos ilustrativos de genes env derivados de retrovirus que pueden emplearse en la invención incluyen, pero no se limitan a: envuelta de MLV, envuelta de 10A1, BAEV, FeLV-B, RD114, SSAV, ébola, Sendai, FPV (virus de peste aviar), y envueltas de virus de la gripe. De manera similar, pueden utilizarse los genes que codifican para envueltas de virus de ARN (por ejemplo, familias de virus de ARN de Picornaviridae, Calciviridae, Astroviridae, Togaviridae, Flaviviridae, Coronaviridae, Paramyxoviridae, Rhabdoviridae, Filoviridae, Orthomyxoviridae, Bunyaviridae, Arenaviridae, Reoviridae, Birnaviridae, Retroviridae) así como de los virus de ADN (familias de Hepadnaviridae, Circoviridae, Parvoviridae, Papovaviridae, Adenoviridae, Herpesviridae, Poxviridae e Iridoviridae). Los ejemplos representativos incluyen, FeLV, VEE, HFVV, WDSV, SFV, rabia, ALV, BIV, BLV, EBV, CAEV, SNV, ChTLV, STLV, MPMV, SMRV, RAV, FuSV, MH2, AEV, AMV, CT10, EIAV.

En otras realizaciones, las proteínas de la envuelta para el pseudotipado de un virus de presente invención incluyen, pero no se limitan a cualquiera de los siguientes virus: gripe A tal como H1N1, H1N2, H3N2 y H5N1 (gripe aviar), gripe B, virus de la gripe C, virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus de la hepatitis D, virus de la hepatitis E, rotavirus, cualquier virus del grupo de virus de Norwalk, adenovirus entéricos, parvovirus, virus de la fiebre del dengue, viruela de los simios, Mononegavirales, lyssavirus tales como virus de la rabia, virus de murciélago de Lagos, virus Mokola, virus Duvenhage, virus del murciélago europeo 1 y 2 y virus del murciélago australiano, Ephemerovirus, Vesiculovirus, virus de la estomatitis vesicular (VEV), virus del herpes tales como virus del herpes simple tipos 1 y 2, varicela zóster, citomegalovirus, virus de Epstein-Bar (VEB), virus del herpes humano (VHH), virus del herpes humano tipo 6 y 8, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus del papiloma, virus del herpes gamma murino, Arenavirus tales como virus de la fiebre hemorrágica argentina, virus de la fiebre hemorrágica boliviana, virus de la fiebre hemorrágica asociado a Sabiá, virus de la fiebre hemorrágica venezolana, virus de la fiebre de Lassa, virus Machupo, virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV), Bunyaviridae tal como virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, Hantavirus, fiebre hemorrágica con virus que provoca síndromes renales, virus de fiebre del Valle del Rift, Filoviridae (filovirus) incluyendo fiebre hemorrágica del ébola y fiebre hemorrágica de Marburgo, Flaviviridae incluyendo virus de la enfermedad de la selva de Kaysanur, virus de la fiebre hemorrágica de Omsk, virus que provoca encefalitis de transmisión por pulgas y Paramyxoviridae tal como virus Hendra y virus de Nipah, viruela mayor y viruela menor (viruela), alfavirus tales como virus de la encefalitis equina venezolana, virus de la encefalitis equina oriental, virus de la encefalitis equina occidental, coronavirus asociado a SARS (SARS-CoV), virus del Nilo Occidental, cualquier virus que provoca encefalitis.

En una realización, la invención proporciona células de empaquetamiento que producen retrovirus recombinante, por ejemplo, lentivirus, pseudotipado con la glicoproteína VSV-G.

Los términos "pseudotipo" o "pseudotipado" tal como se usan en el presente documento, se refieren a un virus cuyas proteínas de la envuelta viral se han sustituido con las de otro virus que posee características preferibles. Por ejemplo, VIH puede pseudotiparse con proteínas de la envuelta de proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VEV-G), que permite que VIH infecte una variedad más amplia de células porque las proteínas de la envuelta de VIH (codificadas por el gen env) dirigen normalmente el virus a células que presentan CD4+. En una realización preferida de la invención, las proteínas de la envuelta lentiviral se pseudotipan con VEV-G. En una realización, la invención proporciona células de empaquetamiento que producen retrovirus recombinante, por ejemplo, lentivirus, pseudotipado con la glicoproteína de la envuelta de VEV-G.

Tal como se usa en el presente documento, el término "líneas celulares de empaquetamiento" se usa en referencia a líneas celulares que no contienen una señal de empaquetamiento, pero expresan de manera estable o transitoria proteínas estructurales virales y enzimas de replicación (por ejemplo, gag, pol y env) que son necesarias para el empaquetamiento correcto de partículas virales. Cualquier línea celular adecuada puede emplearse para preparar células de empaquetamiento de la invención. Generalmente, las células son células de mamífero. En una realización particular, las células usadas para producir la línea celular de empaquetamiento son células humanas. Las líneas celulares adecuadas que pueden usarse incluyen, por ejemplo, células CHO, células BHK, células MDCK, células C3H 10T1/2, células FLY, células Psi-2, células BOSC 23, células PA317, células WEHI, células COS, células BSC 1, células BSC 40, células BMT 10, células VERO, células W138, células MRC5, células A549, células HT1080,

células 293, células T 293, células B-50, células 3T3, células NIH3T3, células HepG2, células Saos-2, células Huh7, células HeLa, células W163, células 211 y células 211A. En realizaciones preferidas, las células de empaquetamiento son células 293, células 293T o células A549. En otra realización preferida, las células son células A549.

5 Tal como se usa en el presente documento, el término “línea celular productora” se refiere a una línea celular que puede producir partículas retrovirales recombinantes, que comprende una línea celular de empaquetamiento y un constructo de vector de transferencia que comprende una señal de empaquetamiento. La producción de partículas virales infecciosas y disoluciones de reserva virales puede llevarse a cabo usando técnicas convencionales. En la técnica se conocen métodos de preparación de disoluciones de reserva virales y se ilustran, por ejemplo, por Y. Soneoka *et al.* (1995) Nucl. Acids Res. 23:628-633, y N. R. Landau *et al.* (1992) J. Virol. 66:5110-5113. Pueden recogerse partículas de virus infecciosos de las células de empaquetamiento usando técnicas convencionales. Por ejemplo, las partículas infecciosas pueden recogerse mediante lisis celular, o recogida del sobrenadante del cultivo celular, tal como se conoce en la técnica. Opcionalmente, las partículas de virus recogidas pueden purificarse si se desea. Los expertos en la técnica conocen bien técnicas de purificación adecuadas.

15 La inserción de un(os) gen(es) u otra secuencia de polinucleótido usando un vector retroviral o lentiviral por medio de infección viral en vez de mediante transfección se denomina “transducción.” En una realización, los vectores retrovirales se transducen en una célula a través de infección e integración de provirus. En determinadas realizaciones, una célula se “transduce” si comprende un gen u otra secuencia de polinucleótido insertado en la célula mediante infección usando un vector viral o retroviral. En realizaciones particulares, una célula transducida comprende el gen u otra secuencia de polinucleótido insertado por un vector retroviral o lentiviral en su genoma celular.

En realizaciones particulares, las células huésped transducidas con vector viral de la invención que expresa un polipéptido terapéutico, por ejemplo, un polipéptido de ABCD1, son para su uso en la administración a un sujeto para tratar y/o prevenir una enfermedad, trastorno o estado, por ejemplo, adrenoleucodistrofia o adrenomieloneuropatía. Otros métodos se refieren al uso de vectores virales en terapia génica, para los que pueden utilizarse determinadas realizaciones de la presente invención, pueden encontrarse en, por ejemplo, Kay, M. A. (1997) Chest 111(6 Supp.):138S-142S; Ferry, N. y Heard, J. M. (1998) Hum. Gene Ther. 9:1975-81; Shiratory, Y. *et al.* (1999) Liver 19:265-74; Oka, K. *et al.* (2000) Curr. Opin. Lipidol. 11:179-86; Thule, P. M. y Liu, J. M. (2000) Gene Ther. 7:1744-52; Yang, N. S. (1992) Crit. Rev. Biotechnol. 12:335-56; Alt, M. (1995) J. Hepatol. 23:746-58; Brody, S. L. y Crystal, R. G. (1994) Ann. N.Y. Acad. Sci. 716:90-101; Strayer, D. S. (1999) Expert Opin. Investig. Drugs 8:2159-2172; Smith-Arica, J. R. y Bartlett, J. S. (2001) Curr. Cardiol. Rep. 3:43-49; y Lee, H. C. *et al.* (2000) Nature 408:483-8.

Tal como se usa en el presente documento, a menos que el contexto deje claro lo contrario, “tratamiento”, y palabras similares tales como “tratado”, “que trata” etc., indica un enfoque para obtener resultados beneficiosos o deseados, incluyendo y preferiblemente resultados clínicos. Tratamiento puede implicar opcionalmente o bien la reducción o bien la mejora de síntomas de la enfermedad o el estado, o el retraso del avance de la enfermedad o el estado.

Tal como se usa en el presente documento, a menos que el contexto deje claro lo contrario, “prevenir”, y palabras similares tales como “previno”, “que previene” etc., indica un enfoque para prevenir, inhibir o reducir la probabilidad de la aparición o recurrencia de, una enfermedad o estado. También se refiere a retrasar la aparición o recurrencia de una enfermedad o estado o retrasar la aparición o recurrencia de los síntomas de una enfermedad o estado. Tal como se usa en el presente documento, “prevención” y palabras similares también incluyen reducir la intensidad, el efecto, los síntomas y/o la carga de una enfermedad o estado antes de la aparición o recurrencia de la enfermedad o el estado.

Tal como se usa en el presente documento, una “cantidad eficaz” o una “cantidad terapéuticamente eficaz” de una célula transducida huésped o una sustancia es aquella cantidad suficiente para afectar un efecto biológico deseado, tal como resultados beneficiosos, incluyendo resultados clínicos.

Tal como se usa en el presente documento “portador farmacéuticamente aceptable” incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes de retardo de la absorción e isotónicos, y similares que son fisiológicamente compatibles, incluyendo medios de cultivo celulares farmacéuticamente aceptables. En una realización, el portador es adecuado para administración parenteral. El portador puede ser adecuado para administración intravascular (por ejemplo, intravenosa o intraarterial), intraperitoneal o intramuscular. Los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen disoluciones o dispersiones estériles acuosas y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones estériles inyectables. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce bien en la técnica. Salvo en la medida en la que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con las células transducidas, se contempla el uso de los mismos en las composiciones farmacéuticas de la invención.

Los artículos “un”, “una” y “el/la” se usan en el presente documento para referirse a uno o a más de uno (es decir, a al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, “un elemento” significa un elemento o más de un elemento.

El uso de la alternativa (por ejemplo, “o”) debe entenderse que significa o bien uno, ambos o bien cualquier combinación de los mismos de las alternativas. Tal como se usa en el presente documento, los términos “incluir” y “comprenden” se usan como sinónimos.

5 Tal como se usa en el presente documento, el término “sobre” o “aproximadamente” se refiere a una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud que varía en tanto como el 15%, el 10%, el 9%, el 8%, el 7%, el 6%, el 5%, el 4%, el 3%, el 2% o el 1% con respecto a una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud de referencia. En una realización, el término “sobre” o “aproximadamente” se refiere a un intervalo de cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud del  $\pm 15\%$ ,  $\pm 10\%$ ,  $\pm 9\%$ ,  $\pm 8\%$ ,  $\pm 7\%$ ,  $\pm 6\%$ ,  $\pm 5\%$ ,  $\pm 4\%$ ,  $\pm 3\%$ ,  $\pm 2\%$  o  $\pm 1\%$  de aproximadamente una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud de referencia.

15 En toda esta memoria descriptiva, a menos que el contexto requiera lo contrario, las palabras “comprender”, “comprende” y “que comprende” se entenderá que implican la inclusión de una etapa o elemento o grupo de etapas o elementos declarados, pero no la exclusión de cualquier otra etapa o elemento o grupo de etapas o elementos. Por “que consiste en” quiere decirse que incluye, y se limita a, lo que sigue a la frase “que consiste en.” Por tanto, la frase “que consiste en” indica que los elementos enumerados son requeridos u obligatorios, y que no pueden estar presentes otros elementos. Por “que consiste esencialmente en” quiere decirse que incluye cualquiera de los elementos enumerados después de la frase, y se limita a otros elementos que no interfieren con o contribuyen a la actividad o acción especificada en la divulgación para los elementos enumerados. Por tanto, la frase “que consiste esencialmente en” indica que los elementos enumerados son requeridos u obligatorios, pero que ningún otro elemento es opcional y pueden o no estar presentes según si afectan o no a la actividad o acción de los elementos enumerados.

20 La referencia en toda esta memoria descriptiva a “una realización” significa que un rasgo, estructura o característica particulares descritos en relación con la realización se incluye en al menos una realización de la presente invención. Por tanto, la aparición de la frase “en una realización” en diversos sitios en toda esta memoria descriptiva no hace necesariamente referencia a la misma realización. Además, los rasgos, estructuras o características particulares pueden combinarse de cualquier manera adecuada en una o más realizaciones.

25 En la siguiente descripción, se exponen determinados detalles específicos con el fin de proporcionar una comprensión completa de las diversas realizaciones de la invención. Sin embargo, un experto en la técnica entenderá que la invención puede practicarse sin estos detalles. Además, debe entenderse que los vectores individuales, o grupos de vectores, derivados de las diversas combinaciones de las estructuras y sustituyentes descritos en el presente documento, se dan a conocer mediante la presente solicitud al mismo grado que si cada vector o grupo de vectores se hubiera establecido de manera individual. Por tanto, la selección de estructuras de vectores particulares o sustituyentes particulares está dentro del alcance de la presente divulgación.

### 35 C. Vectores virales

Se han sometido a prueba vectores retrovirales y lentivirales y se ha encontrado que son vehículos de inserción adecuados para la introducción estable de genes de interés en el genoma de una amplia variedad de células diana. Muchos diseños de vectores se han optimizado para una máxima eficacia de transducción y expresión de transgenes incluyendo secuencias FLAP, RRE, y HPRE o WPRE. En particular, los expertos en la técnica a menudo incluyen secuencias reguladoras postranscripcionales para aumentar la expresión de transgenes. De manera sorprendente, los presentes inventores han descubierto que la inclusión de una secuencia de WPRE no aumenta significativamente la expresión o

45 Esta configuración da como resultado síntesis de un transcrito de ARNm cuya porción 5' comprende las secuencias codificantes de ácido nucleico heterólogas y cuya porción 3' comprende la secuencia de elemento regulador postranscripcional. En realizaciones preferidas, los vectores de la invención carecen de o no comprenden un elemento regulador postranscripcional tal como un WPRE o HPRE porque en algunos casos estos elementos aumentan el riesgo de transformación celular y/o no aumentan sustancialmente o significativamente la cantidad de transcrito de ARNm o aumentan la estabilidad de ARNm. Por tanto, en algunas realizaciones, los vectores de la invención carecen de o no comprenden un WPRE o HPRE como medida de seguridad adicional.

50 La presente invención proporciona además vectores de transferencia, que pueden usarse para poner en práctica los métodos de la presente invención.

Aunque el experto en la técnica apreciará que tales vectores de transferencia pueden producirse usando una variedad de diferentes vectores virales, en realizaciones particulares, el vector de transferencia es un vector lentiviral, en parte puesto que los vectores lentivirales pueden proporcionar inserción, integración y expresión a largo plazo eficaces de transgenes en células que no se dividen tanto *in vitro* como *in vivo*. Una variedad de vectores lentivirales se conocen en la técnica, véase Naldini *et al.*, (1996a, 1996b y 1998); Zufferey *et al.*, (1997); Dull *et al.*, 1998, patentes estadounidenses n.ºs 6.013.516; y 5.994.136, cualquiera de los cuales puede adaptarse para producir un vector de transferencia de la presente invención. En general, estos vectores se basan en plásmidos o en

virus, y están configurados para portar las secuencias esenciales para la transferencia de un ácido nucleico que codifica para un polipéptido terapéutico en una célula huésped.

El genoma lentiviral y el ADN proviral incluyen tres genes encontrados en retrovirus: gag, pol y env, que están flanqueados por dos secuencias de repetición terminal larga (LTR). El gen gag codifica para las proteínas estructurales internas (matriz, cápside y nucleocápside); el gen pol codifica para la ADN polimerasa dirigida por ARN (transcriptasa inversa), una proteasa y una integrasa; y el gen env codifica para glicoproteínas de la envuelta viral. Las LTR 5' y 3' actúan para promover la transcripción y poliadenilación de los ARN de virión, respectivamente. Los lentivirus tienen genes adicionales incluyendo vif, vpr, tat, rev, vpu, nef y vpx. Adyacentes a la LTR 5' hay secuencias necesarias para la transcripción inversa del genoma (el sitio de unión al cebador de ARNt) y para encapsulación eficaz de ARN viral en partículas (el sitio de Psi).

En realizaciones adicionales, el vector lentiviral es un vector de VIH. Por tanto, los vectores pueden derivarse de virus de la inmunodeficiencia humana 1 (VIH-1), virus de la inmunodeficiencia humana 2 (VIH-2), virus de la inmunodeficiencia de simio (SIV), virus de la inmunodeficiencia felina (FIV), virus de la inmunodeficiencia bovina (BIV), virus de la enfermedad de Jembrana (JDV), virus de anemia infecciosa equina (EIAV), virus de encefalitis y artritis caprina (CAEV) y similares. Se prefieren generalmente estructuras principales de vectores basados en VIH (es decir, elementos de secuencia que actúan en cis de genes de VIH y VIH gag, pol y rev) en relación con la mayoría de aspectos de la presente invención en la que los constructos basados en VIH son los más eficaces en la transducción de células humanas.

En diversas realizaciones, los vectores de la invención comprenden un promotor operativamente en una célula microglial unido operativamente a un gen que codifica para un polipéptido que proporciona terapia para adrenoleucodistrofias y/o adrenomieloneuropatías. Los vectores pueden tener una o más LTR, en las que cualquier LTR comprende una o más modificaciones, tales como una o más sustituciones, adiciones o deleciones de nucleótidos. Los vectores pueden comprender además uno de más elementos auxiliares para aumentar la eficacia de transducción (por ejemplo, un cPPT/FLAP), empaquetamiento viral (por ejemplo, una señal de empaquetamiento Psi ( $\Psi$ ), RRE) y/u otros elementos que aumentan la expresión génica terapéutica (por ejemplo, secuencias de poli(A)), excepto porque los vectores de la invención no comprenden un WPRE o HPRE.

En un ejemplo particular, el vector de transferencia de la divulgación comprende una LTR retroviral izquierda (5'); un tramo de polipurina central/fragmento de ADN (cPPT/FLAP); un elemento de exportación retroviral; un promotor activo en una célula microglial, unido operativamente a un polinucleótido que codifica para un polipéptido de casete de unión a ATP, subfamilia D, miembro 1 (ABCD1); y una LTR retroviral derecha (3'); en el que el vector no comprende un elemento regulador postranscripcional de marmota (WPRE).

En un ejemplo particular, el vector de transferencia de la divulgación comprende una LTR retroviral izquierda (5'); un elemento de exportación retroviral; un promotor activo en una célula microglial, unido operativamente a un polinucleótido que codifica para un polipéptido de casete de unión a ATP, subfamilia D, miembro 1 (ABCD1); una LTR retroviral derecha (3'); y una secuencia de poli(A), en el que el vector no comprende un elemento regulador postranscripcional de marmota (WPRE). En otro ejemplo particular, la divulgación proporciona un vector lentiviral que comprende: una LTR izquierda (5'); un cPPT/FLAP; un RRE; un promotor MND unido operativamente a un polinucleótido que codifica para un polipéptido de ABCD1 humano (por ejemplo, SEQ ID NO: 1-2); una LTR derecha (3'); y una secuencia de poliadenilación; en el que el vector no comprende un elemento regulador postranscripcional de marmota (WPRE).

En una realización determinada, la invención proporciona un vector lentiviral que comprende: una LTR de VIH-1 izquierda (5'); una señal de empaquetamiento Psi ( $\Psi$ ); un cPPT/FLAP; un RRE; un promotor MND, unido operativamente a un ADNc que codifica para un polipéptido de ABCD1 humano; una LTR de VIH-1 de autoinactivación (SIN) derecha (3'); y una secuencia de poliadenilación de  $\beta$ -globina de conejo sintética; en el que el vector no comprende un elemento regulador postranscripcional de marmota (WPRE).

En otro ejemplo, la divulgación proporciona un vector que comprende: al menos una LTR; un tramo de polipurina central/fragmento de ADN (cPPT/FLAP); un elemento de exportación retroviral; y un promotor activo en una célula microglial, unido operativamente a un polinucleótido que codifica para un polipéptido de casete de unión a ATP, subfamilia D, miembro 1 (ABCD1); en el que el vector no comprende un elemento regulador postranscripcional de marmota (WPRE).

En un ejemplo particular, la presente divulgación proporciona un vector que comprende al menos una LTR; un cPPT/FLAP; un RRE; un promotor MND unido operativamente a un polinucleótido que codifica para un polipéptido de ABCD1 humano; y una secuencia de poliadenilación; en el que el vector no comprende un elemento regulador postranscripcional de marmota (WPRE).

En un ejemplo determinado, la presente divulgación proporciona al menos una LTR de VIH-1 de SIN; una señal de empaquetamiento Psi ( $\Psi$ ); un cPPT/FLAP; un RRE; un promotor MND, unido operativamente a un ADNc que codifica para un polipéptido de ABCD1 humano; y una secuencia de poliadenilación de  $\beta$ -globina de conejo, en el que el vector no comprende un elemento regulador postranscripcional de marmota (WPRE).



El experto en la técnica apreciará que pueden crearse muchos otros ejemplos diferentes a partir de los ejemplos existentes de la divulgación, de modo que el transgén terapéutico se exprese en una célula microglial en un vector retroviral que carece de un elemento WPRE o HPRE.

#### D. Composiciones y formulaciones

5 La presente divulgación incluye además composiciones farmacéuticas que comprenden células transducidas producidas según métodos descritos en el presente documento y un portador farmacéuticamente aceptable. El portador puede ser adecuado para administración parenteral. El portador puede ser adecuado para administración intravenosa, intraperitoneal o intramuscular. Los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen disoluciones o dispersiones estériles acuosas y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones estériles inyectables. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce bien en la técnica.

10 Las composiciones de la divulgación pueden comprender uno o más polipéptidos, polinucleótidos, vectores que los comprenden, células transducidas, etc., tal como se describe en el presente documento, formulados en disoluciones farmacéuticamente aceptables o fisiológicamente aceptables para la administración a una célula o un animal, o bien solos, o bien en combinación con una o más de otras modalidades de terapia. Se entenderá también que, si se desea, las composiciones de la divulgación pueden administrarse en combinación con otros agentes también, tales como, por ejemplo, otras proteínas, polipéptidos, moléculas pequeñas o diversos agentes farmacéuticamente activos. Prácticamente no existe límite a los demás componentes que también pueden incluirse en las composiciones, siempre que los agentes adicionales no afecten de manera adversa a la capacidad de la composición para suministrar la terapia génica prevista.

15 En las composiciones farmacéuticas de la divulgación, la formulación de excipientes farmacéuticamente aceptables y disoluciones de portador la conoce bien los expertos en la técnica, así como el desarrollo de regímenes de tratamiento y dosificación adecuados para usar las composiciones particulares descritas en el presente documento en una variedad de regímenes de tratamiento, incluyendo por ejemplo, administración y formulación oral, parenteral, intravenosa, intranasal e intramuscular.

20 En determinadas circunstancias, será deseable administrar las composiciones dadas a conocer en el presente documento por vía parenteral, por vía intravenosa, por vía intramuscular, o incluso por vía intraperitoneal tal como se describe, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 5.543.158; patente estadounidense n.º 5.641.515 y patente estadounidense n.º 5.399.363. Pueden prepararse disoluciones de los compuestos activos como base libre o sales farmacéuticamente aceptables en agua mezclada de manera adecuada con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. También pueden prepararse dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para impedir el crecimiento de microorganismos.

25 Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen disoluciones o dispersiones estériles acuosas y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones estériles inyectables (patente estadounidense n.º 5.466.468). En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida hasta el punto de que exista una fácil jeringabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y/o aceites vegetales. Puede mantenerse la fluidez adecuada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede facilitarse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede provocarse mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

30 Para administración parenteral en una disolución acuosa, por ejemplo, la disolución debe tamponarse de manera adecuada si es necesario y el diluyente líquido hacerse en primer lugar isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas disoluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. En este sentido, un medio acuoso estéril que puede emplearse lo conocerán los expertos en la técnica en vista de la presente divulgación. Por ejemplo, una dosificación puede disolverse en 1 ml de disolución de NaCl isotónica y o bien añadirse a 1000 ml de fluido de hipodermoclinis o bien inyectarse en el sitio de infusión propuesto (véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª edición. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins, 2000). Alguna variación en la dosificación se producirá necesariamente según el estado del sujeto que está tratándose. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis apropiada para el sujeto individual. Además, para la administración a seres humanos, las preparaciones deben cumplir normas de esterilidad, pirogenicidad y de seguridad y pureza generales tal como lo requiere la Oficina de Normas Biológicas de la FDA.

Pueden prepararse disoluciones inyectables estériles incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con los diversos otros componentes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido por esterilización por filtración. Generalmente, se preparan dispersiones incorporando los diversos principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los demás componentes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son técnicas de secado a vacío y de secado por congelación que producen un polvo del principio activo más componente deseado adicional a partir de una disolución esterilizada por filtración previamente del mismo.

Las composiciones dadas a conocer en el presente documento pueden formularse en una forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivarse a partir de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férricos, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares. Tras la formulación, las disoluciones se administrarán de manera compatible con la formulación de dosificación y en cantidad tal que es terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas de dosificación tales como disoluciones inyectables, cápsulas de liberación de fármaco, y similares.

Tal como se usa en el presente documento, "portador" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, vehículos, recubrimientos, diluyentes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes de retardo de la absorción e isotónicos, tampones, disoluciones de portador, suspensiones, coloides, y similares. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce bien en la técnica. Salvo en la medida en la que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el principio activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas. También pueden incorporarse principios activos complementarios en las composiciones.

La frase "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades y composiciones moleculares que no producen una reacción alérgica o adversa similar cuando se administra a un ser humano. La preparación de una composición acuosa que contiene una proteína como principio activo se entiende bien en la técnica. Normalmente, tales composiciones se preparan como productos inyectables, o bien como disoluciones o bien suspensiones líquidas; también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para disolución en, o suspensión en, líquido antes de la inyección. La preparación también puede emulsionarse.

Las composiciones pueden administrarse mediante nebulizadores intranasales, inhalación y/u otros vehículos de administración de aerosol. Métodos para administrar genes, polinucleótidos y composiciones de péptido directamente a los pulmones por medio de nebulizadores de aerosol nasal se han descrito, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 5.756.353 y la patente estadounidense n.º 5.804.212. Asimismo, la administración de fármacos usando resinas microparticuladas intranasales (Takenaga *et al.*, 1998) y compuestos de lisofosfatidilglicerol (patente estadounidense n.º 5.725.871) también se conocen bien en las técnicas farmacéuticas. Asimismo, se describe la administración de fármaco transmucosa en forma de una matriz de soporte de politetrafluoroetileno en la patente estadounidense n.º 5.780.045.

La administración puede producirse mediante el uso de liposomas, nanocápsulas, micropartículas, microesferas, partículas lipídicas, vesículas, opcionalmente mezclando con polipéptidos de CPP, y similares, para la introducción de las composiciones de la presente divulgación en células huésped adecuadas. En particular, las composiciones de la presente divulgación pueden formularse para administración o bien encapsuladas en una partícula lipídica, un liposoma, una vesícula, una nanoesfera, una nanopartícula o similar. La formulación y el uso de tales vehículos de administración pueden llevarse a cabo usando técnicas conocidas y convencionales. Las formulaciones y composiciones de la divulgación pueden comprender uno o más supresores y/o activadores comprendidos por una combinación de cualquier número de polipéptidos, polinucleótidos y moléculas pequeñas, tal como se describe en el presente documento, formulados en disoluciones farmacéuticamente aceptables o fisiológicamente aceptables (por ejemplo, medio de cultivo) para administración a una célula o un animal, o bien solos, o bien en combinación con una o más de otras modalidades de terapia. Se entenderá también que, si se desea, las composiciones de la divulgación pueden administrarse en combinación con otros agentes también, tales como, por ejemplo, células, otras proteínas o polipéptidos o diversos agentes farmacéuticamente activos.

En un ejemplo particular, una formulación o composición según la presente divulgación comprende una célula puesta en contacto con una combinación de cualquier número de polipéptidos, polinucleótidos y moléculas pequeñas, tal como se describe en el presente documento.

En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona formulaciones o composiciones adecuadas para la administración de sistemas de vector viral (es decir, transducción mediada por virus) incluyendo, pero sin limitarse a, vectores retrovirales (por ejemplo, lentivirales).

Las formulaciones a modo de ejemplo para la administración *ex vivo* también pueden incluir el uso de diversos agentes de transfección conocidos en la técnica, tales como fosfato de calcio, electroporación, choque térmico y

diversas formulaciones de liposoma (es decir, transfección mediada por lípidos). Los liposomas, tal como se describe en mayor detalle a continuación, son bicapas lipídicas que atrapan una fracción de fluido acuoso. El ADN se asocia de manera espontánea con la superficie externa de liposomas catiónicos (en virtud de su carga) y estos liposomas interaccionarán con la membrana celular.

- 5 En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona composiciones farmacéuticamente aceptables que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más polinucleótidos o polipéptidos, tal como se describe en el presente documento, formulados junto con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables (aditivos) y/o diluyentes (por ejemplo, medio de cultivo celular farmacéuticamente aceptable).

10 Los ejemplos particulares de la divulgación pueden comprender otras formulaciones, tales como las que se conocen bien en la técnica farmacéutica, y se describen, por ejemplo, en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª edición. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

#### E. Métodos de terapia génica

15 Los vectores retrovirales proporcionan métodos mejorados de terapia génica para la adrenoleucodistrofia y la adrenomieloneuropatía. Tal como se usa en el presente documento, el término "terapia génica" se refiere a la introducción de un gen en un genoma celular. En diversas realizaciones, un vector viral de la invención comprende un promotor que expresa un transgén terapéutico que codifica para un polipéptido que proporciona beneficios curativos, preventivos o de mejora a un sujeto al que se le diagnostica o que se sospecha que padece una adrenoleucodistrofia o una adrenomieloneuropatía. El virus puede infectar y transducir la célula *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*. En realizaciones *ex vivo* e *in vitro*, las células transducidas pueden administrarse entonces a un sujeto que necesita terapia. La presente invención contempla que los sistemas de vector, las partículas virales y las células transducidas de la invención puedan usarse para tratar, prevenir y/o mejorar una adrenoleucodistrofia o una adrenomieloneuropatía en un sujeto.

20 En diversas realizaciones, los vectores retrovirales son para su uso en la administración mediante inyección directa a una célula, tejido u órgano de un sujeto que necesita terapia génica, *in vivo*. En otras diversas realizaciones, las células se transducen *in vitro* o *ex vivo* con vectores de la invención. Las células transducidas son entonces para su uso en la administración a un sujeto que padece adrenoleucodistrofia o adrenomieloneuropatía.

25 Las células adecuadas para transducción y administración en los métodos de terapia génica dados a conocer en el contexto de la invención incluyen, pero no se limitan a células madre, células progenitoras y células diferenciadas. En determinadas realizaciones, las células transducidas son células madre de médula ósea, células madre de cordón umbilical o células madre mesenquimatosas.

30 En diversas realizaciones, el uso de células madre se prefiere porque tienen la capacidad de diferenciarse en los tipos celulares apropiados cuando se administran a un nicho biológico particular, *in vivo*. El término "célula madre" se refiere a una célula que es una célula indiferenciada que puede (1) autorrenovarse a largo plazo, o la capacidad de generar al menos una copia idéntica de la célula original, (2) diferenciación al nivel de célula individual en múltiples, y en algunos casos sólo uno, tipos celulares especializados y (3) de regeneración funcional *in vivo* de tejidos. Las células madre se subclasifican según su potencial de desarrollo como totipotentes, pluripotentes, multipotentes y oligo/unipotentes. "Autorrenovación" se refiere a una célula con una capacidad única de producir células hijas inalteradas y de generar tipos celulares especializados (potencia). La autorrenovación puede lograrse de dos maneras. La división celular asimétrica produce una célula hija que es idéntica a la célula parental y una célula hija que es diferente de la célula parental y es una célula progenitora o diferenciada. La división celular asimétrica no aumenta el número de células. La división celular simétrica produce dos células hijas idénticas. "Proliferación" o "expansión" de células se refiere a células que se dividen de manera simétrica.

35 Tal como se usa en el presente documento, el término "pluripotente" significa la capacidad de una célula de formar todos los linajes del cuerpo u organismo (es decir, el propio embrión). Por ejemplo, las células madre embrionarias son un tipo de células madre pluripotentes que pueden formar células de cada una de las tres capas germinales, el ectodermo, el mesodermo y el endodermo. Tal como se usa en el presente documento, el término "multipotente" se refiere a la capacidad de una célula madre adulta de formar múltiples tipos celulares de un linaje. Por ejemplo, las células madre hematopoyéticas pueden formar todas las células del linaje de células sanguíneas, por ejemplo, células linfoides y mieloides.

40 Tal como se usa en el presente documento, el término "progenitor" o "células progenitoras" se refiere a células que tienen la capacidad de autorrenovarse y diferenciarse en células más maduras. Muchas células progenitoras se diferencian a lo largo de un único linaje, pero pueden tener una capacidad proliferativa bastante amplia.

45 Las células madre hematopoyéticas (HSC) dan lugar a células progenitoras hematopoyéticas comprometidas (HPC) que pueden generar todo el repertorio de células sanguíneas maduras a lo largo de la vida de un organismo. El término "célula madre hematopoyética" o "HSC" se refiere a células madre multipotentes que dan lugar a todos los tipos de células sanguíneas de un organismo, incluyendo linajes mieloides (por ejemplo, monocitos y macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, eritrocitos, megacariocitos/plaquetas, células dendríticas) y linfoides (por ejemplo, células T, células B, células NK), y otros conocidos en la técnica (véase Fei, R., *et al.*, patente estadounidense n.º

5.635.387; McGlave, *et al.*, patente estadounidense n.º 5.460.964; Simmons, P., *et al.*, patente estadounidense n.º 5.677.136; Tsukamoto, *et al.*, patente estadounidense n.º 5.750.397; Schwartz, *et al.*, patente estadounidense n.º 5.759.793; DiGuisto, *et al.*, patente estadounidense n.º 5.681.599; Tsukamoto, *et al.*, patente estadounidense n.º 5.716.827). Cuando se trasplantan en animales o seres humanos irradiados de manera mortal, las células progenitoras y madre hematopoyéticas pueden repoblar el conjunto de células hematopoyéticas eritroides, de neutrófilos-macrófagos, megacariocitos y linfoides.

En realizaciones preferidas, las células transducidas son células progenitoras y/o madre hematopoyéticas aisladas de médula ósea, sangre del cordón umbilical o circulación periférica. En realizaciones particulares preferidas, las células transducidas son células madre hematopoyéticas aisladas de médula ósea, sangre del cordón umbilical o circulación periférica.

Las células de la invención pueden ser autólogas/autogénicas (“propias”) o no autólogas (“no propias”, por ejemplo, alogénicas, singénicas o xenogénicas). “Autólogas”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a células del mismo sujeto. “Alogénicas”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a células de la misma especie que difieren genéticamente con respecto a la célula en comparación. “Singénicas”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a células de un sujeto diferente que son genéticamente idénticas a la célula en comparación. “Xenogénicas”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a células de una especie diferente a la célula en comparación. En realizaciones preferidas, las células de la invención son alogénicas.

Un “sujeto”, tal como se usa en el presente documento, incluye cualquier animal que presenta un síntoma de una adrenoleucodistrofia o una adrenomieloneuropatía que puede tratarse con los vectores de terapia génica, productos terapéuticos basados en células y métodos dados a conocer en otra parte en el presente documento. Los sujetos adecuados (por ejemplo, pacientes) incluyen animales de laboratorio (tales como ratón, rata, conejo o cobaya), animales de granja y animales domésticos y mascotas (tales como un gato o perro). Se incluyen primates no humanos y, preferiblemente, pacientes humanos. Los sujetos típicos incluyen animales que presentan cantidades aberrantes (cantidades menores o mayores que un sujeto “normal” o “sano”) de una o más actividades fisiológicas que pueden modularse mediante terapia génica.

Tal como se usa en el presente documento “tratamiento” o “tratar”, incluye cualquier efecto beneficioso o deseable de los síntomas o patología de una enfermedad o estado patológico, y puede incluir incluso reducciones mínimas en uno o más marcadores medibles de la enfermedad o el estado que está tratándose. El tratamiento puede implicar opcionalmente o bien la reducción o la mejora de síntomas de la enfermedad o el estado, o bien el retraso del avance de la enfermedad o el estado. “Tratamiento” no indica necesariamente erradicación o cura completa de la enfermedad o el estado, o síntomas asociados de los mismos.

Tal como se usa en el presente documento, “prevenir”, y palabras similares tales como “previno”, “que previene” etc., indican un enfoque para prevenir, inhibir o reducir la probabilidad de la aparición o reaparición de una enfermedad o estado. También se refiere a retrasar la aparición o reaparición de una enfermedad o estado o retrasar la aparición o reaparición de los síntomas de una enfermedad o estado. Tal como se usa en el presente documento, “prevención” y palabras similares también incluyen reducir la intensidad, el efecto, los síntomas y/o la carga de una enfermedad o estado antes de la aparición o reaparición de la enfermedad o el estado.

Tal como se usa en el presente documento, el término “cantidad” se refiere a “una cantidad eficaz” o “una cantidad eficaz” de un virus o célula terapéutica transducida para lograr un resultado beneficioso o profiláctico o terapéutico deseado, incluyendo resultados clínicos.

Una “cantidad profilácticamente eficaz” se refiere a una cantidad de un virus o célula terapéutica transducida eficaz para lograr el resultado profiláctico deseado. Normalmente, pero no necesariamente, puesto que se usa una dosis profiláctica en sujetos antes de o en un estadio anterior de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz es menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

Una “cantidad terapéuticamente eficaz” de un virus o célula terapéutica transducida puede variar según factores tales como el estado patológico, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad de las células madre y progenitoras para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del virus o células terapéuticas transducidas se compensa por los efectos terapéuticamente beneficiosos. El término “cantidad terapéuticamente eficaz” incluye una cantidad que es eficaz para “tratar” un sujeto (por ejemplo, un paciente).

En una realización preferida, la invención proporciona células transducidas con el potencial de desarrollarse en células microgliales cerebrales. En realizaciones particulares, se transducen células madre hematopoyéticas con un vector de la invención y para su uso en un método de tratamiento de adrenoleucodistrofia o adrenomieloneuropatía. Las células madre hematopoyéticas son el origen de células microgliales cerebrales y, por tanto, se prefieren.

Las células transducidas pueden administrarse como parte de un trasplante de médula ósea en un individuo que se ha sometido o no a terapia ablativa de médula ósea. En una realización, las células transducidas de la invención se administran en un trasplante de médula ósea a un individuo que se ha sometido a terapia de médula ósea quimioablativa o radioablativa. En realizaciones preferidas, el sujeto es un varón joven.

En una realización, el uso comprende que una dosis de células transducidas se administre a un sujeto por vía intravenosa. En realizaciones preferidas, el uso comprende que células madre hematopoyéticas transducidas se administren por vía intravenosa a un sujeto.

5 En realizaciones particulares, el uso comprende que los pacientes reciban una dosis de células madre hematopoyéticas transducidas de aproximadamente  $1 \times 10^5$  células/kg, aproximadamente  $5 \times 10^5$  células/kg, aproximadamente  $1 \times 10^6$  células/kg, aproximadamente  $2 \times 10^6$  células/kg, aproximadamente  $3 \times 10^6$  células/kg, aproximadamente  $4 \times 10^6$  células/kg, aproximadamente  $5 \times 10^6$  células/kg, aproximadamente  $6 \times 10^6$  células/kg, aproximadamente  $7 \times 10^6$  células/kg, aproximadamente  $8 \times 10^6$  células/kg, aproximadamente  $9 \times 10^6$  células/kg, aproximadamente  $1 \times 10^7$  células/kg, aproximadamente  $5 \times 10^7$  células/kg, aproximadamente  $1 \times 10^8$  células/kg, o más en una única dosis intravenosa. En una realización determinada, el uso comprende que los pacientes reciban una dosis de células madre hematopoyéticas transducidas de aproximadamente  $1 \times 10^5$  células/kg a aproximadamente  $1 \times 10^8$  células/kg, de aproximadamente  $1 \times 10^6$  células/kg a aproximadamente  $9 \times 10^6$  células/kg, de aproximadamente  $2 \times 10^6$  células/kg a aproximadamente  $8 \times 10^6$  células/kg, de aproximadamente  $2 \times 10^6$  células/kg a aproximadamente  $8 \times 10^6$  células/kg, de aproximadamente  $2 \times 10^6$  células/kg a aproximadamente  $5 \times 10^6$  células/kg, de aproximadamente  $3 \times 10^6$  células/kg a aproximadamente  $5 \times 10^6$  células/kg, de aproximadamente  $3 \times 10^6$  células/kg a aproximadamente  $4 \times 10^8$  células/kg, o cualquier dosis intermedia de células/kg.

20 Las células transducidas pueden estimularse con citocinas para su expansión usando métodos existentes en la técnica. En diversas realizaciones, el uso comprende que a los sujetos se les administren 1, 2, 3, 4, 5, o más dosis a lo largo de días, meses o años, según sea necesario para mantener o aumentar la terapia.

En realizaciones particulares, se transducen células madre hematopoyéticas con un vector de la invención que comprende un promotor activo en células microgliales, por ejemplo, un promotor MND, que se une operativamente a un gen que codifica para un polipéptido, por ejemplo, ABCD1, que puede usarse para tratar, prevenir o mejorar una adrenoleucodistrofia y/o adrenomieloneuropatía en un sujeto.

25 La presente invención se describirá ahora más completamente mediante los siguientes ejemplos. Esta invención, sin embargo, puede realizarse de muchas formas diferentes y no debe interpretarse como limitada a las realizaciones expuestas en el presente documento; más bien, estas realizaciones se proporcionan para que esta divulgación sea exhaustiva y completa, y transmitirán totalmente el alcance de la invención a los expertos en la técnica.

### Ejemplos

#### 30 Ejemplo 1

#### Comparación de transducciones génicas en células madre hematopoyéticas humanas normales usando vectores lentivirales ABCD1 con o sin el WPRE

##### *Resumen experimental:*

35 Un vector lentiviral que comprende un promotor MND unido operativamente a un ADNc que codifica para ABCD1 humano, y un vector de elemento WPRE (véase la figura 1; CG1711 MND-ALD) no está disponible para desarrollo comercial. Como resultado, los solicitantes emprendieron un programa de desarrollo de vectores para identificar un vector lentiviral apropiado para llevarlo a futuros ensayos clínicos. El vector comercialmente aceptable se elaboró como resultado del programa de desarrollo de vectores y no alteró el gen de ABCD-1 unido operativamente al promotor MND. De manera sorprendente, la retirada del WPRE del vector no alteró la eficacia de transducción y expresión de transgenes en células humanas hematopoyéticas. Se realizaron las siguientes series de experimentos en células hematopoyéticas usando ensayos de progenitores a corto y largo plazo para comparar dos vectores de 40 MND-ALD, pLBP100 (véase la figura 1 y SEQ ID NO: 1; se retiró WPRE) y pLBP140 (véase la figura 1; tiene WPRE funcional), que diferían con respecto a la presencia de WPRE.

##### *Constructos de vectores lentivirales*

45 Todos los vectores lentivirales contenían el ADNc de casete de unión a ATP humano normal, subfamilia D (AL), miembro 1 (ABC1) bajo el control del promotor MND. La figura 1 y la tabla 1 resumen los diferentes componentes y su posición en los vectores de MND-ALD CG1711, pLBP100 y pLBP140.

Tabla 1: Resumen de vectores

	pLBP100	pLBP140	
Fuentes de VIH	VIH1 (NL4-3) N.º de registro m19921	VIH1 (NL4-3) N.º de registro m19921	
LTR en 5':			
Híbrido/WT	WT	WT	
R	+	+	

U5	+	+	
Secuencias Gag:			
ORF alterado	Dos codones de terminación	Dos codones de terminación	
Longitud	Hasta el sitio Nsi I, 120 pb, más largo	Hasta el sitio Nsi I, 120 pb, más largo	
RRE y cPPT y S/A	cPPT/CTS	cPPT/CTS	Esta área de vector diseñada de manera única por diferentes grupos
	RRE (500 pb)	RRE (500 pb)	
Promotor	MND	MND	
ABCD-1 seq	Nt. 346-2638	Nt. 346-2638	N.º de registro NM_000033
5'UT	+	+	
3'UT	-	+	
WPRES	No	Sí (mutado)	
LTR en 3' SIN	+	+	Misma delección
Poli A	Poli A de β-globina de conejo sintética (rβgpA) en lugar de U5	Poli A de β-globina de conejo sintética (rβgpA) en lugar de U5	rβgpA sintética añade otro grado de autoinactivación retirando la mayoría de la secuencia de nucleótidos de LTR

*Transducción*

Se produjeron sobrenadantes de pLBP100 y pLBP140 lentivirales mediante transfección con fosfato de calcio de células 293T con 5 plásmidos (vectores pLBP100 o pLBP140, HPV 275 - gag-pol, ΨN 15 - VSV-G env, p633 - rev, HPV601 - tat). Se obtuvo pLBP100 concentrado tras ultracentrifugación, se resuspendió en medio SCGM (CellGenix Inc., Alemania GMBH), y se crioconservó a <-70°C en crioviales de un único uso. Se determinaron los títulos infecciosos a partir del análisis citométrico de flujo de células 3T3 transducidas.

Se realizó la comparación de los vectores lentivirales pLBP100 y pLBP140 para determinar la transducción de células madre hematopoyéticas humanas entre los cuatro experimentos separados resumidos en la tabla 2. Se ilustran procedimientos y ensayos para experimentos realizados en las figuras 2 y 3 respectivamente.

Tabla 2: Resumen experimental

Expt.	Fuente de células CD34+	Vector de MND-ALD	N.º de lote de LV	Título (TU/ml)	MOI	RN	Ensayos de cultivo
072010 (BBB6)	Lonza: BM nueva Lonza: n.º de lote OF3668C	pLBP100	100701	1,3 x 10 <sup>8</sup>	12	-	Líquido y CFC
		pLBP140	100717	1,9 x 10 <sup>7</sup>	8,6	-	
081010 (BBB8)	AllCells: mPB nueva n.º de lote A2186	pLBP100	100701	1,3 x 10 <sup>8</sup>	25	-	Líquido y CFC
		pLBP140	100724	1,0 x 10 <sup>8</sup>	25	-	
091410 (BBB9)	AllCells: mPB congelada n.º de lote A2186	pLBP100	100820	1,2 x 10 <sup>8</sup>	25	-	Líquido y CFC
		pLBP140	100730	1,3 x 10 <sup>8</sup>	25	-	
080610	Lonza: BM nueva Lonza: n.º de lote OF3739B	pLBP100	100701	1,3 x 10 <sup>8</sup>	25	+	Líquido, CFC y LTC-IC
		pLBP140	100724	1,0 x 10 <sup>8</sup>	25	+	

Se lavaron células CD34<sup>+</sup> de médula ósea (BM) humanas nuevas (Lonza, Walquersville, MD) o células CD34<sup>+</sup> de sangre periférica movilizadas (mPB) con G-CSF humano nuevas o crioconservadas (AllCells, LLC, Emeryville, CA) y se cultivaron durante 18 horas en SCGM complementado con IL-3 recombinante humana (60 ng/ml), Flt-3L (100 ng/ml), TPO (100 ng/ml) y SCF (100 ng/ml) (Peprotech) a una concentración celular de 1 x 10<sup>6</sup> células/ml.

Entonces se retiraron las células, se lavaron y se resuspendieron en volúmenes de 200 µl únicos (expt. 080610) o por triplicado (expts. 072010, 081010 y 091410) en placas de 96 pocillos de fondo plano a una concentración de 2 x 10<sup>6</sup> células/ml en sobrenadante de SCGM (control simulado) o pLBP100 o pLBP140) a MOI de 8,6 a 25 (1,7-5,0 x 10<sup>7</sup> TU/ml de título final) complementado con las mismas concentraciones de citocinas y sulfato de protamina 8 µg/ml añadido con virus. En el expt. 080610, se realizaron transducciones en placas de 96 pocillos recubiertas

previamente con retronectina 20 µg/ml (Takara Bio Inc, Shiga, Japón) con incubación durante la noche a 4°C.

*Ensayos de progenitor a corto plazo*

5 A las 24 horas tras la adición del virus, se lavaron las células y, o bien (1) se resuspendieron en medio SCGM complementado con la misma concentración de citocinas y se incubaron adicionalmente durante 21 días o bien (2) 1- se cultivaron en medio MetoCult H4434 (Stem Cell Technologies) para determinar las células formadoras de colonias (CFC).

Las colonias mieloides (UFC-GM) y eritroides (BFU-E) totales se enumeraron a los 14 días y las células se suspendieron en PBS, se lavaron y se preparó ADN genómico con el kit DNEASy (QIAGEN) (1-2 x 10<sup>6</sup> células viables).

10 *Ensayo de células iniciadoras de cultivo a largo plazo (LTC-IC)*

Se inocularon ocho placas de 96 pocillos con la línea celular estromal de médula ósea de ratón MS-5 en medio Alfa complementado con suero bovino fetal al 10% y se irradiaron con radiación gamma (30 Gy) cuando se hicieron casi confluentes.

15 A los dos días tras la irradiación, se inocularon las capas estromales de MS-5 establecidas previamente con células de prueba CD34+ humanas en 200 µl de SFEM StemSpan (medio libre de suero, Stem Cell Technologies, Vancouver, Canadá) a diversas diluciones con 16 pocillos por dilución (2000 células por pocillo en 16 pocillos, 1000 células por pocillo en 16 pocillos, 500 células por pocillo en 16 pocillos, 250 células por pocillo en 16 pocillos, 125 células por pocillo en 16 pocillos, 62 células por pocillo en 16 pocillos, 31 células por pocillo en 16 pocillos, 16 células por pocillo en 16 pocillos, 8 células por pocillo en 16 pocillos). Se cultivaron 100.000 células CD34+ 20 adicionales a granel durante 5 semanas en células alimentadoras MS-5. Cada semana, se reemplazaron 100 µl del medio por 100 µl de SFEM StemSpan nuevo. Tras 5 semanas, se recogieron los cultivos y entonces se sembró el contenido completo en Metocult™ GF+ H4434 (500 µl de metilcelulosa por pocillo de placas de 12 pocillos) para el crecimiento de 14 días de las colonias. Después se recogieron colonias individuales y se extrajo ADN para análisis de PCR posterior usando cebadores dirigidos a secuencias gag en el vector y cebadores dirigidos a una secuencia 25 genómica (gen Epo) con el fin de tener un control positivo que confirme la presencia de ADN genómico tras la extracción (n.º de SOP GTX/RE/PBM/M-023 y LTGC/RE/PBM/M-07). Las frecuencias y los intervalos de confianza del 95% de LTC-IC se calcularon usando el software L-calc, versión 1.1 (Stem Cell Technologies).

*Determinación del número de copias del vector (VCN)*

30 Se determinó el VCN promedio por célula a partir de PCR cuantitativa (tiempo real) (QPCR) en preparaciones de ADN de o bien cultivos líquidos o bien células de colonias agrupadas en cultivos en metilcelulosa tras dilución y lavado en PBS. Se realizó QPCR en el sistema de detección de secuencias ABI Prism 7000 con reactivos ABI y placas de 96 pocillos.

Sonda de gag y cebadores humanos usados para cuantificar el vector:

GAG-F (cebador directo) 5'ggagctagaacgattcgcagtta 3'

35 GAG-R (cebador inverso) 5' ggtgttagctgtcccagttattgtc 3'

GAG-P (sonda, antisentido) 5'-(FAM)-acagcctctgatgtctctaaaggccagg-(TAMRA)-3'

Sonda de β-actina y cebadores humanos usados para cuantificar ADN genómico para normalización:

Sonda: 5' VIC-cctggcctcgtgtccaccttcca-TAMRA

Directo-5' tccgtgtggatcggcggtcca 3'

40 Inverso-5' ctgcttgctgatccacatctg 3'.

Se evaluó una centésima parte del ADN genómico eluido (aproximadamente 50-100 ng) usando mezcla maestra universal 1x TaqMan®, 0,72 uM cada cebador y sonda 0,35 uM en una reacción de 25 ul con el programa de cuantificación absoluta y programa de ciclado térmico por defecto.

*Expresión de transgenes mediante citometría de flujo*

45 Se realizó la expresión de la proteína ABCD1 (ALDP) se realizó en células fijadas y permeabilizadas (reactivos de fij. y perm. A y B, n.ºs de cat. GAS001 y GAS002, Invitrogen) usando el anticuerpo monoclonal de ratón anti-ALDP humano (ABCD1) (clon 1D6, n.º de lote LV1383343, Chemicon) seguido por tinción con AcM de rata anti-IgG1 de ratón conjugado con PE (clon A85-1, BD Pharmingen). Se usó el clon de anticuerpo monoclonal de IgG1 de ratón MOPC-21 (BioLegend) como control de isotipo.

*Análisis estadístico*

Se analizó la comparación de los valores de grupo dentro de cada experimento usando prueba de la U de Mann-Whitney no paramétrica de dos colas (GraphPad Prism v. 3.0) y cuando el tamaño de muestra fue suficiente ( $n \geq 3$ ). La significación entre los grupos se determinó a un valor de  $p$  de por debajo de 0,05.

5 Resultados:*Efecto sobre las frecuencias de células progenitoras*

Se comparó el rendimiento de progenitores mieloides (UFC-GM) y eritroides (BFU-E) funcionales para los cuatro experimentos en la figura 4 y no muestran efecto significativo de la adición de sobrenadantes de o bien pLBP100 o bien pLBP140 para transducciones por triplicado en un primer conjunto de experimentos (experimentos 072010, 081010 y 091410). Para el segundo conjunto de experimentos (experimentos 080610) en los que se compararon seis conjuntos de cultivos en metilcelulosa para transducciones individuales, se observó un aumento significativo en progenitores mieloides con adición de pLBP100 mientras que se observó una disminución significativa del rendimiento de colonias eritroides tras el tratamiento con pLBP100 y disminuyó además tras la transducción de pLBP140.

15 Las frecuencias del LTC-IC más primitivo fueron en promedio menores tras la transducción con los dos vectores lentivirales (figura 5) pero, dado que los intervalos de confianza del 95% se solapaban, entonces estas diferencias no fueron significativas ( $p > 0,05$ ).

*Eficacia de transducción mediante PCR del vector*

20 El análisis de PCR en tiempo real de ADN genómico aislado de células mantenidas en cultivo líquido a lo largo de 35 días mostró un número de copias del vector (VCN) estimado mayor en todos los puntos de tiempo para pLBP100 en comparación con pLBP140 en el segundo conjunto de experimentos (figura 6A).

25 Esto también se vio reflejado en el VCN promedio mayor para CFC agrupadas que crecen en los cultivos de metilcelulosa y el porcentaje de colonias mieloides positivas para el vector del mismo experimento (figura 6B y C). La comparación entre los experimentos por triplicado del primer conjunto de experimentos, sin embargo, no mostró diferencia significativa en VCN de colonias agrupadas o del porcentaje de colonias que dieron positivo para el vector.

La figura 7 muestra que el VCN promedio y el porcentaje de colonias mieloides positivas para el vector disminuyeron tras el LTC-IC de 5 semanas tanto para los grupos de vector con las células transducidas con pLBP100 que tenían de nuevo mayor VCN (1,1 frente a 0,4 copias) como la proporción de colonias positivas (el 51% frente al 35%).

*Expresión de transgenes de ALDP mediante citometría de flujo*

30 Se muestran ejemplos de perfiles de fluorescencia de células teñidas a nivel intracelular con el anticuerpo anti-ALDP en los histogramas en la figura 8A1 y A2 a partir de los cuales se determinó el porcentaje positivo (determinado a más allá del 0,5% de los respectivos controles simulados) y la razón de la mediana de las intensidades de fluorescencia (MFI) y se presentan en la figura 8B y C. El nivel de expresión de transgenes varió entre los experimentos con un porcentaje promedio mayor de células de expresión que se produce para los grupos de pLBP100 en comparación con pLBP140 en los expts. 072010 y 080610. Sin embargo, se observó lo contrario en el expt. 091410 y niveles comparables en el expt. 081010. Las comparaciones estadísticas entre los experimentos por triplicado no mostraron diferencias significativas o bien en el porcentaje de células ALDP<sup>+</sup> o bien el MFI ( $p > 0,05$ ).

Conclusiones:

40 Se realizaron comparaciones entre cuatro experimentos separados usando dos preparaciones del vector lentiviral pLBP100 preclínico y tres preparaciones del vector pLBP140 que contenía WPRE y que implicaban transducciones de células CD34<sup>+</sup> humanas normales que se originan a partir de médula ósea o sangre periférica movilizada con GCSF. Con la excepción de un aumento en progenitores mieloides y una disminución en progenitores eritroides en el experimento 080610, no hubo toxicidad significativa de los sobrenadantes, o bien para progenitores tempranos o bien los LTC-IC más primitivos. Hubo una tendencia a eficacias de transducción menores para el pLBP140 según el VCN promedio o la proporción de colonias mieloides que contienen vector o LTC-IC pero esto no fue estadísticamente significativo para aquellos experimentos de tamaño de muestra suficiente ( $n=3$ ). El nivel de expresión de transgenes dado por los dos vectores produjo resultados dispares, mostrando dos experimentos un mayor porcentaje de células ALDP<sup>+</sup> a partir de pLBP100 y mostrando un experimento un porcentaje menor en comparación con pLBP140. Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

50 En general, parece no haber ninguna ventaja al añadir el WPRE al vector de MND-ALD. Por tanto, los vectores de la presente invención proporcionan una seguridad aumentada y eficacia igual o superior en comparación con vectores que contienen WPRE. Además, los resultados muestran que los vectores de la invención son muy adecuados para desarrollo adicional y aplicación clínica.

Ejemplo 2



Evaluación de la corrección funcional de deficiencia en proteína ALD en fibroblastos humanos primarios con ALD defectuosa

*Resumen experimental*

5 La acumulación de ácidos grasos de cadena muy larga (VLCFA), particularmente la cadena C26, se denomina a menudo el "distintivo" bioquímico de ALD. Hubbard, Mol Genet. Metab. 97:212-220 (2009). La transducción de células defectuosas con vectores retrovirales que contiene el ADNc de ABCD1 restaura los niveles de proteína ALD (ALDP) funcionales y da como resultado un nivel disminuido de VLCFA. Esto se ha mostrado en diferentes poblaciones celulares incluyendo líneas de fibroblastos primarios de pacientes con ALD.

10 El ensayo de liso-PC C26:0 (ensayo de LPC), desarrollado en el Kennedy Krieger Institute (Baltimore, MD), mide VLCFA mediante cromatografía de líquidos y espectrofotometría de masas en tándem. Este método se desarrolló para gotas de sangre de recién nacidos y también se validó en plasma y fibroblastos cutáneos cultivados. En este ejemplo, se usó el ensayo de liso-PC C26:0 para demostrar la corrección funcional del defecto bioquímico en fibroblastos de pacientes con ALD. El fin de este experimento era comparar la eficacia de los vectores pLBP100 (p100) y pLBP140 (p140) en la reducción de los niveles de VLCFA en células de fibroblastos con ALD defectuosa modificadas por vector.

*Líneas celulares*

20 Se obtuvieron células de fibroblastos humanos primarios GM04496 y AG01440 del Coriell Cell Repository (Camden, NJ, EE.UU.). Las células GM04496 son fibroblastos humanos no transformados aislados de un paciente negativo para ALD con una mutación desconocida del gen de ABCD1. Las células AG01440 son fibroblastos humanos normales. Las células se hicieron crecer en DMEM (GIBCO Life Technologies, Carlsbad, CA) con FBS al 15% (HyClone FBS, GIBCO Life Technologies) a 37°C, el 5% de CO<sub>2</sub> en un incubador humidificado.

Las células TF-1 (número de ATCC® CRL-2003™) son una línea de linfoblastos humanos derivados de una eritroleucemia de médula ósea. Las células se hicieron crecer en RPMI-1640 (GIBCO Life Technologies) con FBS al 10%.

25 Las células 293T (Universidad de Stanford) que se usan para producir vectores lentivirales se hicieron crecer en DMEM con FBS al 10%.

*Protocolo de transducción y siembra en placa para el ensayo de Liso-PC*

30 Se transdujeron células subconfluentes con sobrenadante viral en medios + Polybrene 8 ug/ml (bromuro de hexadimetrina, Sigma, St Louis MO) durante 14-16 h. Se reemplazó medio nuevo al día siguiente. Tan pronto como 3 días tras la transducción, la mayoría de las células se sembraron en placa por triplicado en placas de 12 pocillos (2 réplicas para extracción lipídica y una para análisis de proteínas. (N.º de Falcon 35-3043). Un número equivalente de células de control normales (293T, AG01440 o TF-1) también se sembraron en placa o se centrifugaron. Se lavaron las monocapas celulares dos veces con tampón 1X HBSS (GIBCO Life Technologies) y se congelaron *in situ* a -20°C. El método de congelación se sometió a prueba en primer lugar en Kennedy Krieger y se determinó que era comparable a la cosecha de monocapas celulares nuevas. Las células restantes se mantuvieron en cultivo.

*Aislamiento de ADN genómico y determinación del número de copias del vector (VCN)*

Las células restantes tras la siembra en placa para el ensayo de LPC se mantuvieron en cultivo para la cosecha de ADN genómico hasta al menos el día 9 tras la transducción para el aislamiento de ADN y el análisis de VCN. Se completó la extracción de lípidos y proteínas en el Kennedy Krieger Institute.

40 Resultados:

*Análisis de liso-PC de células 4496 y diversos controles normales y negativos*

45 Las células 4496 y células 1440 de fibroblastos normales se sembraron en placa para su análisis. ALDP fue detectable en células TF-1 y células 293 mediante inmunotinción y citometría de flujo. Por tanto, estas células también se sometieron a ensayo como controles positivos alternativos (es decir, fenotipo de ALDP normal) para niveles iniciales de LPC C26:0. Las muestras se evaluaron en cuatro análisis independientes.

Los niveles iniciales de LPC C26:0 oscilaron entre proteína 3-50 pmol/mg en células con un fenotipo normal, y las células 4496 tenían niveles elevados en cada análisis. En general, hubo al menos una diferencia de 5 veces (razón por debajo de 0,2) en los niveles de LPC C26:0 en células normales en comparación con 4496. Esta razón fue similar a los resultados notificados para las gotas de sangre de pacientes.

50 *Comparación de células 4496 transducidas con p100 y p140*

Se transdujeron células 4496 con p100 y p140. Se analizaron las células para determinar VLCFA y VCN tal como se describe en el presente documento. Los resultados del ensayo de LisoPC se muestran en la tabla 3. Se calcula el

promedio de los pocillos por duplicado y se normalizan frente a las células transducidas de manera simulada. La razón de corrección de VLCFA con respecto a simulado frente a VCN se muestra en la figura 10. A medida que disminuye VCN a  $\leq 1$  copia, se espera que la población celular sea una mezcla de células no transducidas y células con 1 ó 2 copias de vector por célula; por tanto se espera que VLCFA disminuya (figura 10).

5 Tabla 3: Resultados de LPC C26:0 en células 4496 transducidas con lenti-D p100 y LVVp140

	MOI	pmoles totales de LPC C26:0/mg de proteína (pocillos por duplicado)		Promedio de pocillos por duplicado	Razón de células simuladas-txd
Células 4496 simuladas-txd		50,53	58,94	54,73	1,00
Lenti-D p100	3	8,82	8,47	8,65	0,16
	1	11,05	12,57	11,81	0,21
	0,3	20,59	25,57	23,08	0,42
p140	3	15,55	10,81	13,18	0,24
	1	10,35	15,37	12,86	0,23
	0,3	22,74	33,34	28,04	0,51
Células 293T normales	6,98	6,75	6,87	0,12	6,98

10 La razón de 0,2 se estableció como el nivel de células con un fenotipo normal en comparación con células 4496 simuladas-txd. La acumulación de VLCFA en células 4496 se corrige al nivel de células normales para ambos vectores cuando VCN  $\geq \sim 1,5$ . La tendencia para una disminución en la corrección está presente con ambos vectores en VCN 1,0- 0,6.

Conclusiones:

15 El ensayo de liso-PC C26:0 realizado en el Kennedy Krieger Institute (Hubbard 2009), midió VLCFA mediante el método de cromatografía de líquidos y espectrofotometría de masas en tándem, confirmó el defecto bioquímico en las células GM04496 de la línea celular del paciente con ALD de acumulación de C26. Tras la transducción con p100 y p140, las células fueron positivas para la expresión de ALDP, tal como se demuestra mediante citometría de flujo (datos no mostrados) y células con VCN promedio  $\geq 1,5$  mostraron corrección completa de la acumulación de VLCFA al nivel de células con un fenotipo normal. Se obtuvieron resultados equivalentes cuando se compararon células transducidas con p100 y p140, lo que respalda la eficacia de p100, que carece de las secuencias de WPRE.

**Lista de secuencias**

20 <110> bluebird bio, Inc.

Denaro, Maria Joann

Finer, Mitchell Howard

Veres, Gabor

25 <120> VECTORES DE TERAPIA GÉNICA PARA LA ADRENOLEUCODISTROFIA Y LA ADRENOMIELONEUROPATÍA

<130> Documento BLBD-003/01WO

<150> Documento US 61/495.857

<151> 09-06-2011

<160> 3

30 <170> FastSEQ para Windows versión 4.0

<210> 1

<211> 2297

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

35 <400> 1

ES 2 710 452 T3

```

ccagccccag tccctacgcg gcagccagcc caggtgacat gccggtgctc tccaggcccc 60
ggcctggcgg ggggaacacg ctgaagcgca cggccgtgct cctggccctc ggggcctatg 120
gagcccacaa agtctacccc ttggtgcgcc agtgcctggc cccggccagg ggtcttcagg 180
cgcccggcgg ggagcccacg caggaggcct cgggggtcgc ggcggccaaa gctggcatga 240
accgggtatt cctgcagcgg ctctgtggc tcctgcggct gctgttcccc cgggtcctgt 300
gccgggagac ggggctgctg gccctgcact cggccgcctt ggtgagccgc accttcctgt 360
cgggtgatgt ggcccgcctg gacggaaggc tggcccgtg catcgtccgc aaggaccgc 420
gggcttttgg ctggcagctg ctgcagtggc tcctcatcgc cctccctgct accttcgtca 480
acagtgccat ccgttacctg gagggccaac tggccctgtc gttccgcagc cgtctggtgg 540
cccacgccta ccgcctctac ttctcccagc agacctacta cgggtcagc aacatggacg 600
ggcggctcgg caaccctgac cagtctctga cggaggacgt ggtggccttt gcggcctaca 660
tggcccacct ctactccaac ctgaccaagc cactcctgga cgtggctgtg acctcctaca 720
ccctgcttcg ggcggcccgc tcccgtggag ccggcacagc ctggccctcg gccatcgccg 780
gcctcgtggt gttcctcacg gccaacgtgc tgcggccctt ctgcaccaag ttcggggagc 840
tgggtggcaga ggaggcgcgg cggaaggggg agctgcgcta catgcactcg cgtgtggtgg 900
ccaactcgga ggagatcgcc ttctatgggg gccatgaggt ggagctggcc ctgctacagc 960
gctcctacca ggacctggcc tcgcagatca acctcatcct tctggaacgc ctgtggtatg 1020
ttatgctgga gcagttcctc atgaagtatg tgtggagcgc ctcgggcctg ctcatggtgg 1080
ctgtccccat catcactgcc actggctact cagagtcaga tgcagaggcc gtgaagaagg 1140
cagccttggg aaagaaggag gaggagctgg tgagcgagcg cacagaagcc ttcactattg 1200
cccgcaacct cctgacagcg gctgcagatg ccattgagcg gatcatgtcg tcgtacaagg 1260
aggtgacgga gctggctggc tacacagccc ggggtcacga gatgttccag gtatttgaag 1320
atgttcagcg ctgtcacttc aagaggccca gggagctaga ggacgctcag gcggggctg 1380
ggacatagg ccggtctggt gtccgtgtgg agggccccct gaagatccga ggccaggtgg 1440
tggatgtgga acaggggatc atctgcgaga acatccccat cgtcacgccc tcaggagagg 1500
tgggtggtggc cagcctcaac atcaggggtg aggaaggcat gcatctgctc atcacaggcc 1560
ccaatggctg cggcaagagc tccctgttcc ggatcctggg tgggctctgg ccacagtacg 1620
gtggtgtgct ctacaagccc ccaccccagc gcatgttcta catcccgcag aggccctaca 1680
tgtctgtggg ctccctgctg gaccaggtga tctaccgga ctcagtggag gacatgcaaa 1740
ggaagggcta ctcggagcag gacctggaag ccacccctgga cgtcgtgcac ctgcaccaca 1800
tcctgcagcg ggagggaggt tgggaggcta tgtgtgactg gaaggacgtc ctgtcgggtg 1860
gcgagaagca gagaatcggc atggcccgcg tgttctacca caggcccaag tacgccctcc 1920
tggatgaatg caccagcgcc gtgagcatcg acgtggaagg caagatcttc caggcggcca 1980
aggacgcggg cattgccctg ctctccatca cccaccggcc ctccctgtgg aaataccaca 2040
cacacttgct acagttcgat ggggagggcg gctggaagtt cgagaagctg gactcagctg 2100
cccgcctgag cctgacggag gagaagcagc ggctggagca gcagctggcg ggcattccca 2160
agatgcagcg gcgcctccag gagctctgcc agatcctggg cgaggccgtg gccccagcgc 2220
atgtgccggc acctagcccc caaggccctg gtggcctcca ggtgcctcc acctgactcg 2280
agggggggcc cggtacc

```

<210> 2

<211> 2238

5 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

ES 2 710 452 T3

```

atgccggtgc tctccaggcc ccggccctgg cgggggaaca cgctgaagcg cacggccgtg 60
ctcctggccc tcgcggccta tggagcccac aaagtctacc ccttgggtgcg ccagtgcctg 120
gccccggcca ggggtcttca ggcgcccgcc ggggagccca cgcaggaggc ctccggggtc 180
gcggcgcca aagctggcat gaaccgggta ttctgcagc ggctcctgtg gctcctgcgg 240
ctgctgttcc cccgggtcct gtgcccggag acggggctgc tggccctgca ctccggccgc 300
ttggtgagcc gcaccttctt gtcggtgtat gtggcccgcc tggacggaag gctggcccgc 360
tgcatacgtcc gcaaggaccg gcgggctttt ggctggcagc tgctgcagtg gctcctcatc 420
gccctccctg ctaccttctg caacagtgcc atccgttacc tggagggcca actggccctg 480
tcgttccgca gccgtctggt ggcccacgcc taccgcctct acttctccca gcagacctac 540
taccgggtca gcaacatgga cgggcggcct cgcaaccctg accagtctct gacggaggac 600
gtggtggcct ttgcggcctc tgtggcccac ctctactcca acctgacca gccactcctg 660
gactggcctt cgccatcgc cggcctcgtg gtgttctca cggccaacgt gctgcgggcc 780
ttctcgccca agttcgggga gctggtggca gaggaggcgc ggcggaaggg ggagctgcgc 840
tacatgcact cgcgtgtggt ggccaactcg gaggagatcg ctttctatgg gggccatgag 900
gtggagctgg ccctgctaca gcgctcctac caggacctgg cctcgcagat caacctcatc 960
cttctggaac gcctgtggtg tgttatgctg gagcagttcc tcatgaagta tgtgtggagc 1020
gcctcgggcc tgctcatggt ggctgtcccc atcatcactg cactggcta ctcagagtca 1080
gatgcagagg ccgtgaagaa ggcagccttg gaaaagaagg aggaggagct ggtgagcgag 1140
cgcacagaag ccttactat tgcccgcaac ctctgacag cggctgcaga tgccattgag 1200
cggatcatgt cgtcgtacaa ggaggtgacg gagctggctg gctacacagc ccgggtgcac 1260
gagatgttcc aggtatthga agatgttcag cgtgtcact tcaagaggcc cagggagcta 1320
gaggacgctc aggcggggtc tgggaccata ggccggtctg gtgtccgtgt ggagggcccc 1380
ctgaagatcc gaggccaggt ggtggtggtg gaacagggga tcatctgcga gaacatcccc 1440
atcgtcacgc cctcaggaga ggtggtggtg gccagcctca acatcagggt ggaggaaggc 1500
atgcatctgc tcatcacagg cccaatggc tgcggcaaga gctccctgtt ccgcatcctg 1560
ggtgggctct ggcccacgta cgggtggtgt ctctacaagc cccacccca gcgcatgttc 1620
tacatcccgc agaggcccta catgtctgtg ggctccctgc gtgaccaggt gatctacccg 1680
gactcagtg aggacatgca aaggaagggc tactcggagc aggacctgga agccatcctg 1740
gacgtcgtgc acctgcacca catcctgcag cgggaggag gttgggaggc tatgtgtgac 1800
tggaaaggacg tcctgtcggg tggcgagaag cagagaatcg gcatggcccg catgttctac 1860
cacaggccca agtacgccct cctggatgaa tgcaccagcg ccgtgagcat cgacgtgga 1920
ggcaagatct tccaggcggc caaggacgcy ggcatgccc tgctctccat caccaccgg 1980
ccctccctgt ggaaatacca cacacactg ctacagttcg atggggaggg cggctggaag 2040
ttcgagaagc tggactcagc tgcccgcctg agcctgacgg aggagaagca gcccctggag 2100
cagcagctgg cgggcattcc caagatgcag cggcgcctcc aggagctctg ccagatcctg 2160
ggcgaggccg tggcccagc gcatgtgccg gcacctagcc cgcaaggccc tgggtggcctc 2220
cagggtgcct ccacctga 2238

```

<210> 3

<211> 399

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> una secuencia de promotor MND

<400> 3

```

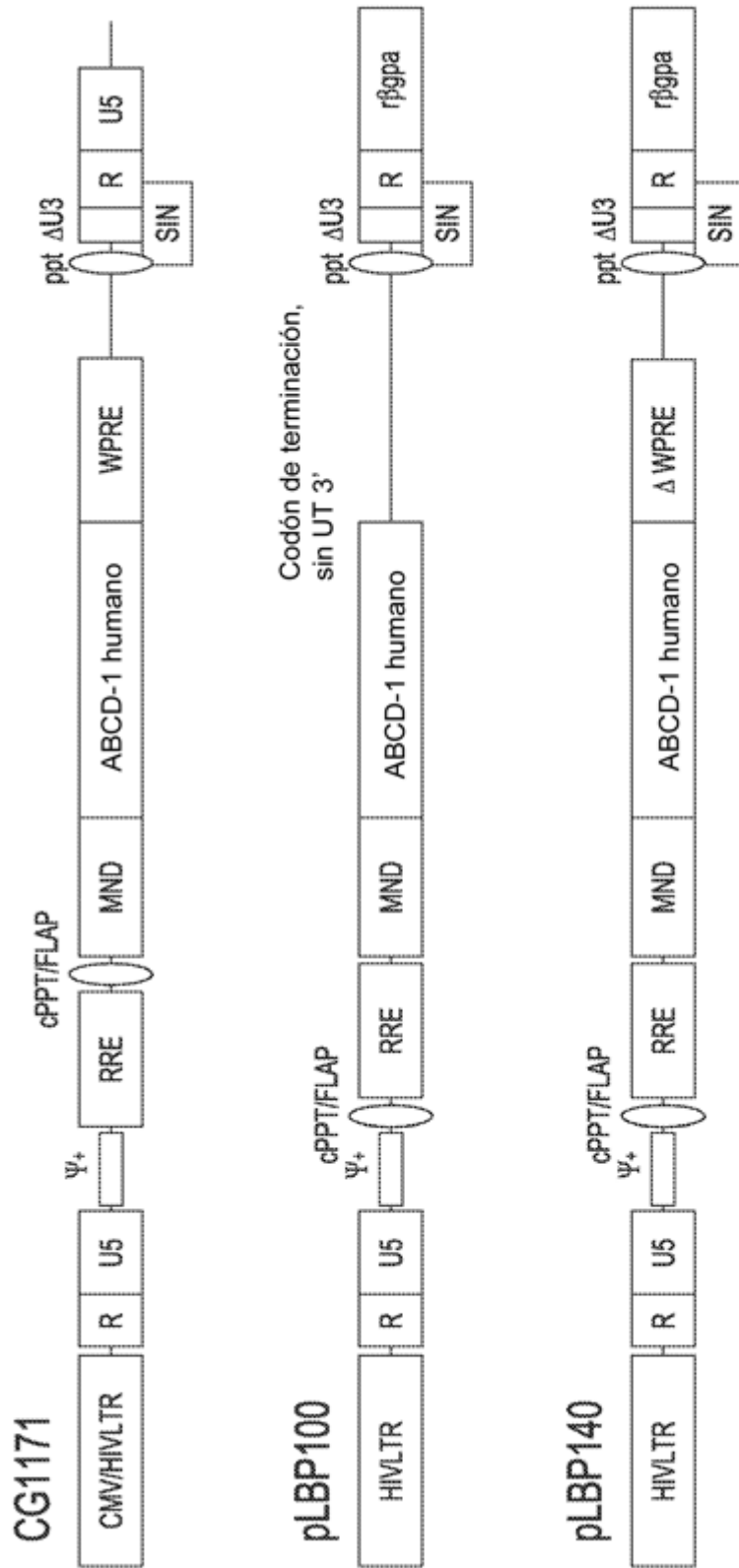
tttatttagt ctccagaaaa aggggggaat gaaagacccc acctgtaggt ttggcaagct 60
aggatcaagg ttaggaacag agagacagca gaatatgggc caaacaggat atctgtggtg 120
agcagttcct gccccggctc agggccaaga acagttggaa cagcagaata tgggccaac 180
aggatatctg tggtaagcag ttctgcccc ggctcagggc caagaacaga tgggtccccag 240
atgcggtccc gccctcagca gtttctagag aacctcaga tgtttccagg gtgccccaaag 300
gacctgaaat gaccctgtgc cttattttaa ctaaccaatc agttcgtctc tcgcttctgt 360
tcgcgcgctt ctgctccccg agctcaataa aagagccca 399

```

10

**REIVINDICACIONES**

1. Vector lentiviral que comprende:
  - (a) una LTR de VIH-1 izquierda (5');  
5
  - (b) una señal de empaquetamiento Psi ( $\Psi$ );
  - (c) un tramo de polipurina central/fragmento de ADN (cPPT/FLAP);
  - (d) un elemento de exportación retroviral de RRE; y
  - (e) un promotor con sitio de unión a cebador dl587rev sustituido, con región de control negativo delecionada, potenciador del virus del sarcoma mieloproliferativo (MND), unido operativamente a un ADNc que codifica para un polipéptido de casete de unión a ATP humano, subfamilia D, miembro 1 (ABCD1);  
10
  - (f) una LTR de VIH-1 de autoinactivación (SIN) derecha (3'); y
  - (g) una secuencia de poliadenilación de  $\beta$ -globina de conejo sintética;  
en el que el vector lentiviral no comprende un elemento regulador postranscripcional de marmota (WPRE).
2. Célula de mamífero que comprende un vector lentiviral según la reivindicación 1.
3. Célula de empaquetamiento que comprende: un primer polinucleótido que codifica para gag, un segundo polinucleótido que codifica para pol, un tercer polinucleótido que codifica para env y un vector lentiviral según la reivindicación 1.  
15
4. Célula productora que comprende un vector lentiviral según la reivindicación 1.
5. Partícula de vector producida por la célula productora según la reivindicación 4.
6. Célula huésped transducida con el vector lentiviral según la reivindicación 1, en la que la célula es una célula madre somática, una célula progenitora o una célula madre hematopoyética, y en la que la célula no es una célula madre embrionaria humana.  
20
7. Célula progenitora o madre hematopoyética transducida con un vector según la reivindicación 1, para su uso en un método de tratamiento de adrenoleucodistrofia o adrenomieloneuropatía.
8. Célula progenitora o madre hematopoyética según el uso según la reivindicación 7, en la que la fuente de las células progenitoras o madre hematopoyéticas es médula ósea, sangre del cordón umbilical o circulación periférica.  
25
9. Célula progenitora o madre hematopoyética según el uso según la reivindicación 9 o la reivindicación 10, en la que la célula progenitora o madre hematopoyética es una célula madre hematopoyética CD34+ autóloga.
10. Vector lentiviral según la reivindicación 1, para su uso en terapia génica, en el que la terapia génica trata o previene la adrenoleucodistrofia o adrenomieloneuropatía.  
30



*FIG. 1*

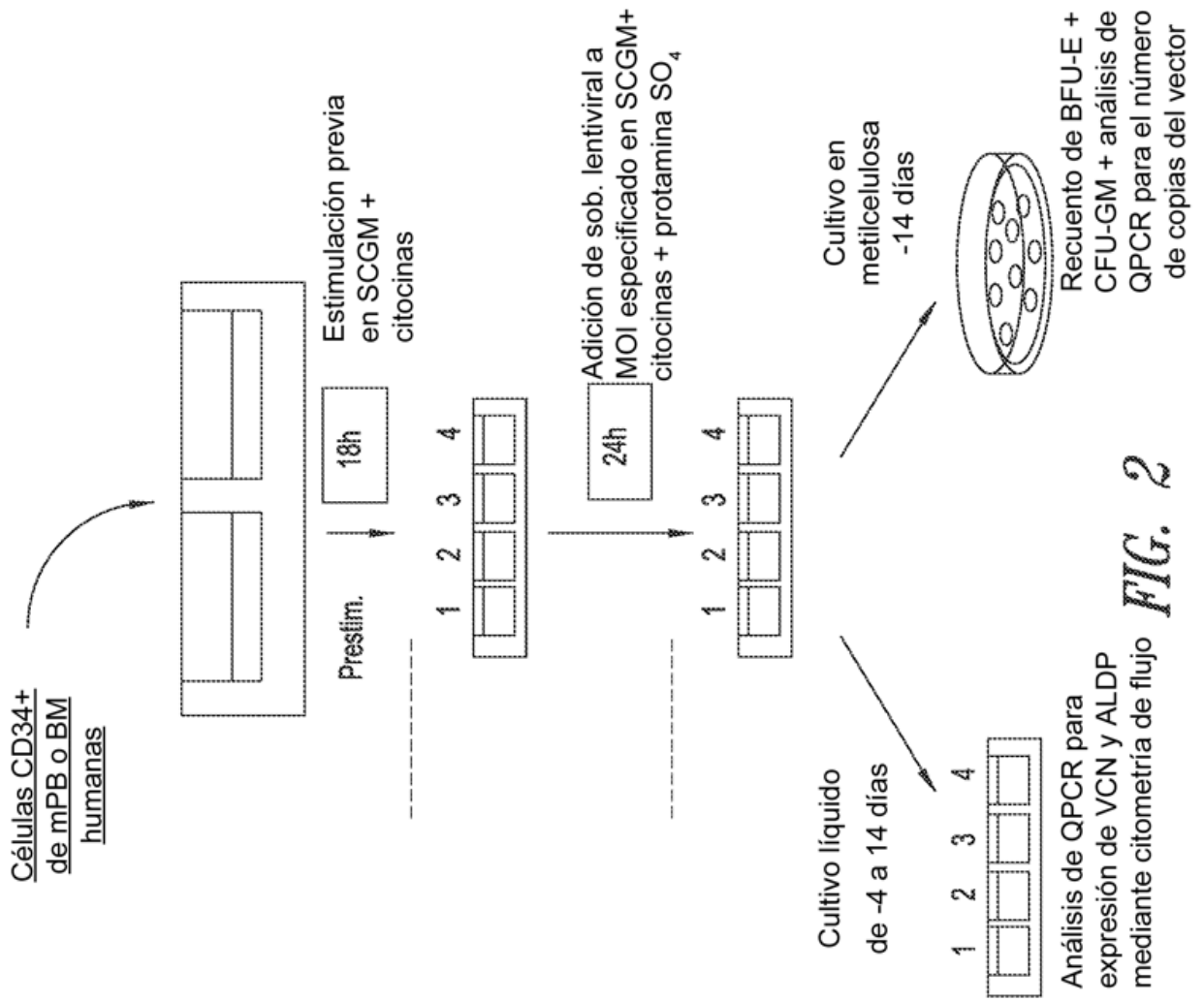
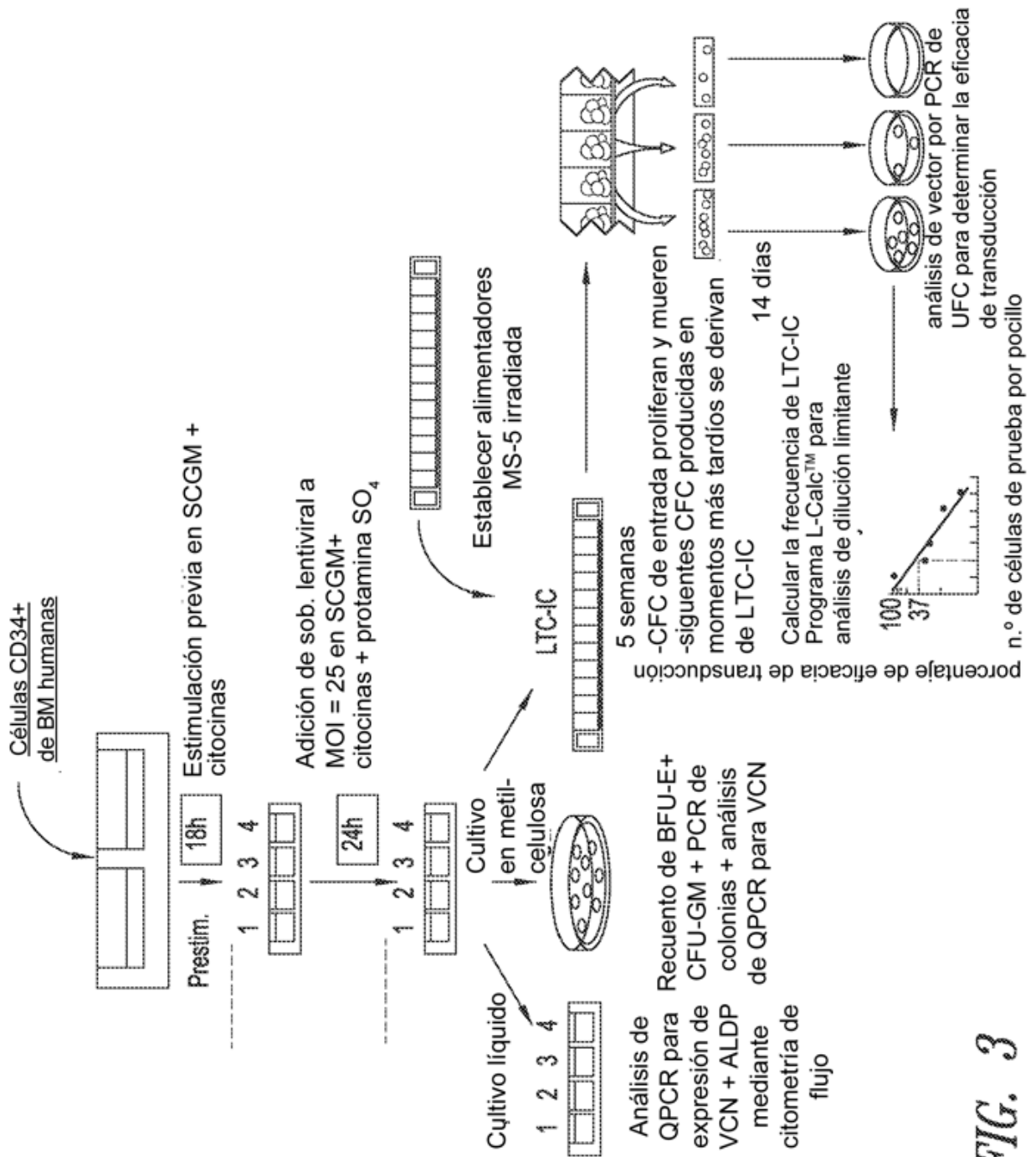


FIG. 2



**FIG. 3**



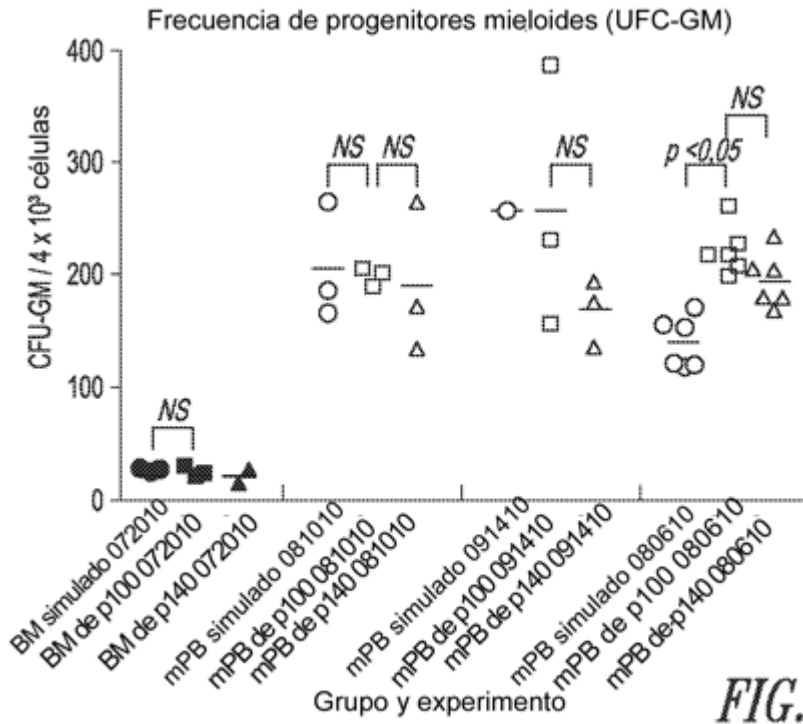


FIG. 4A

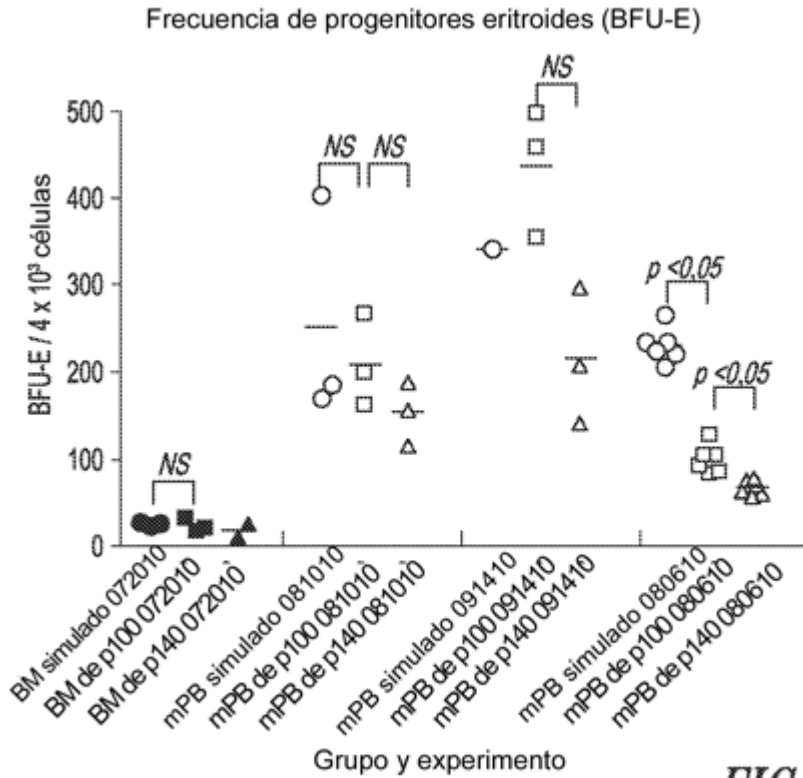
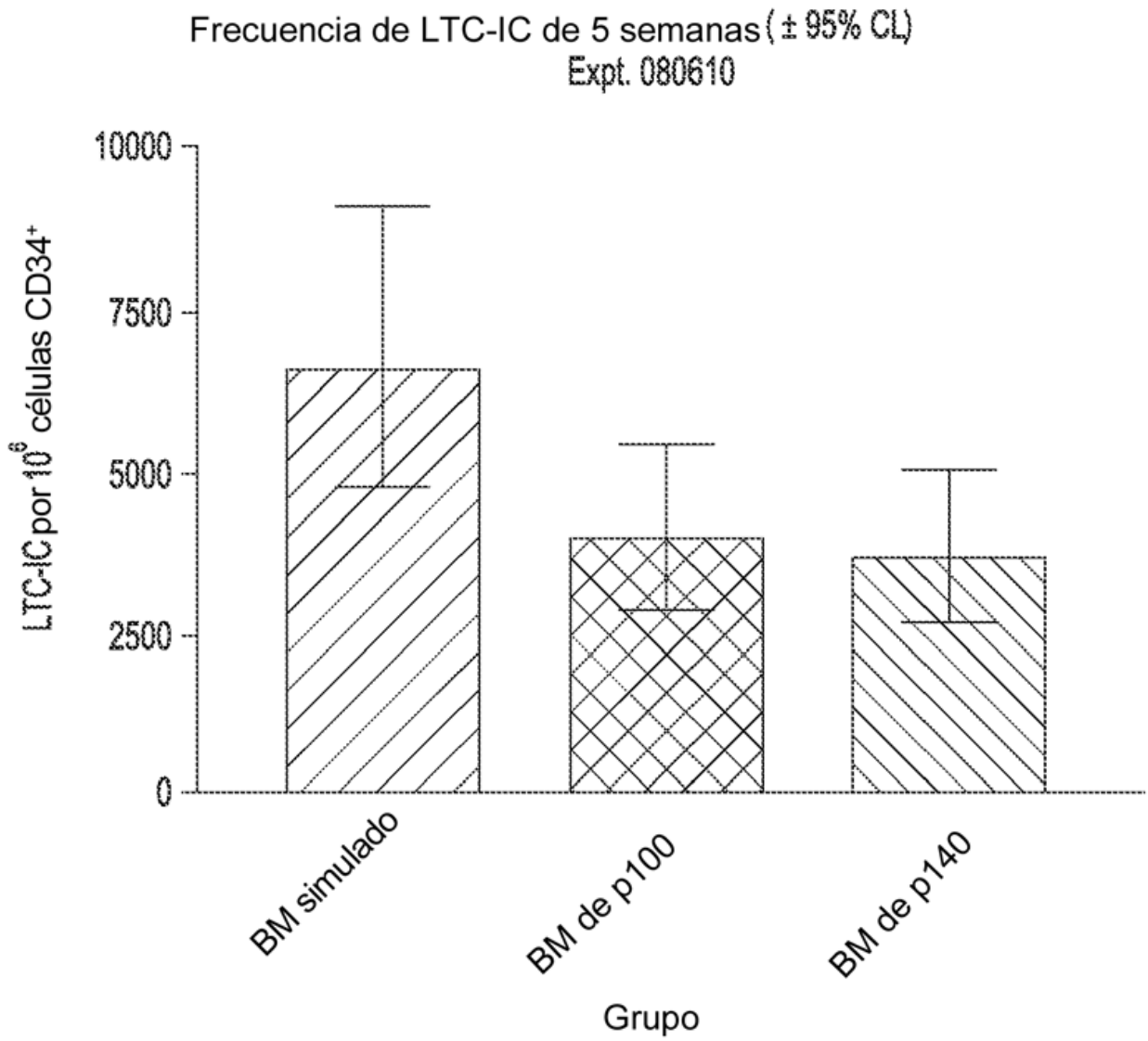
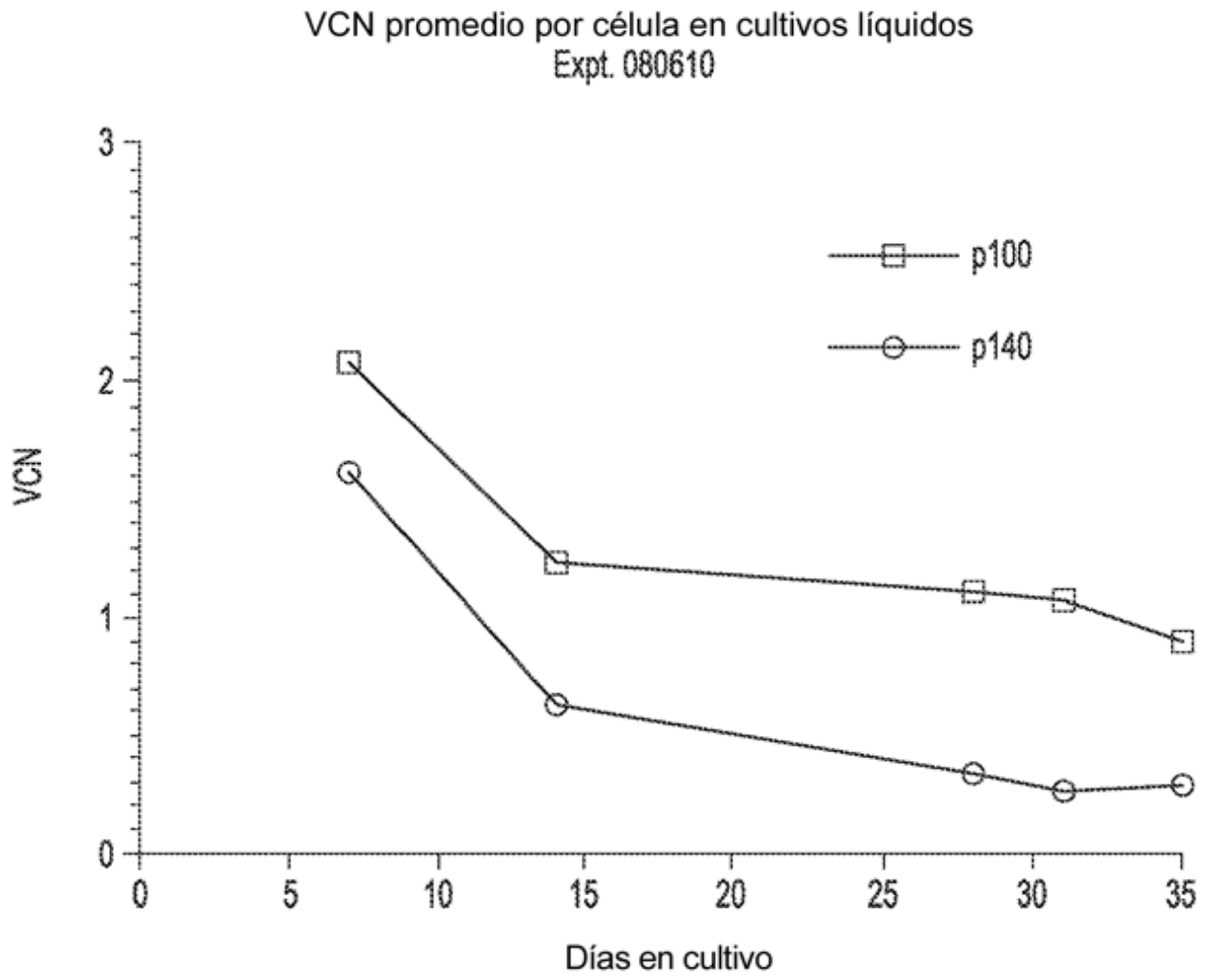


FIG. 4B



*FIG. 5*



*FIG. 6A*

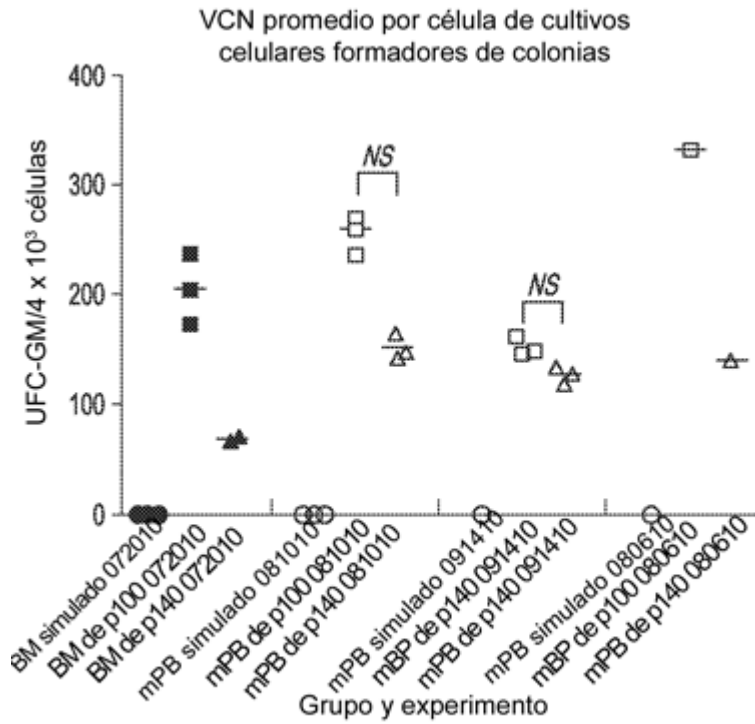


FIG. 6B

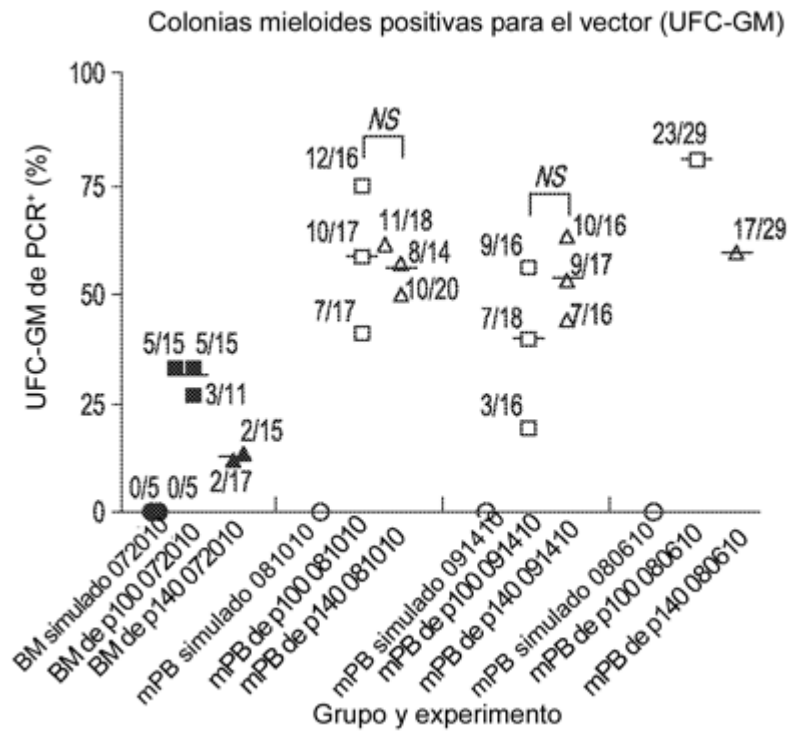


FIG. 6C

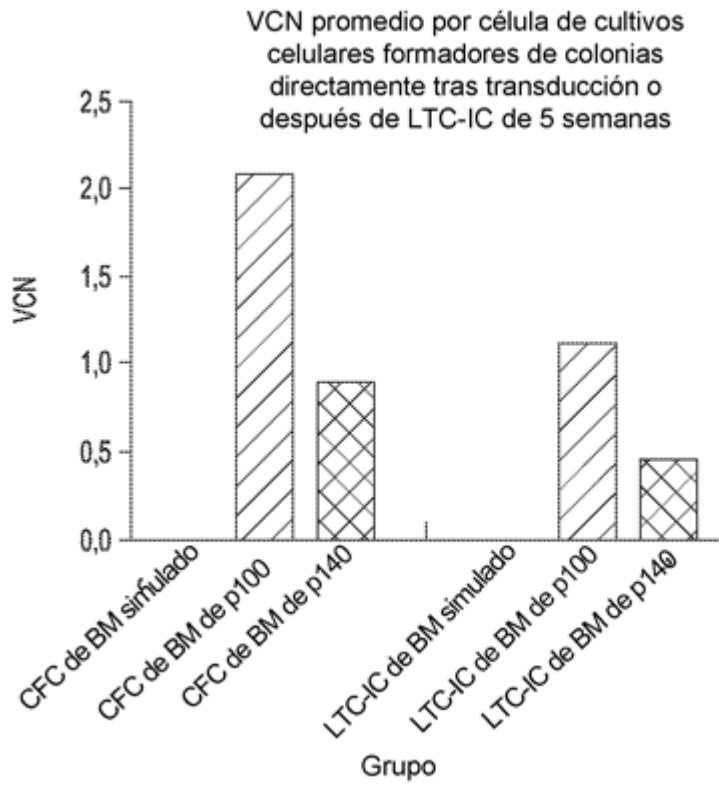


FIG. 7A

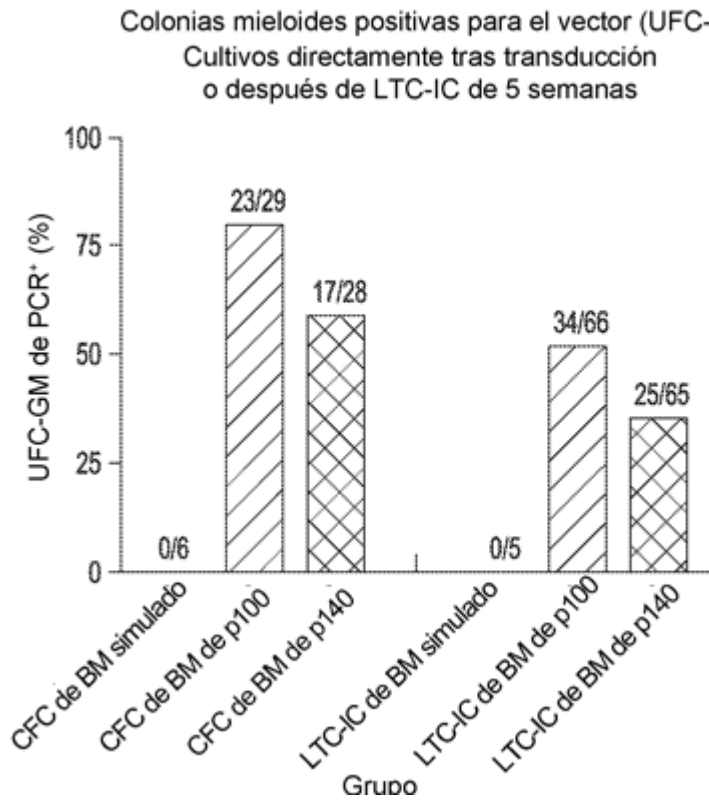


FIG. 7B

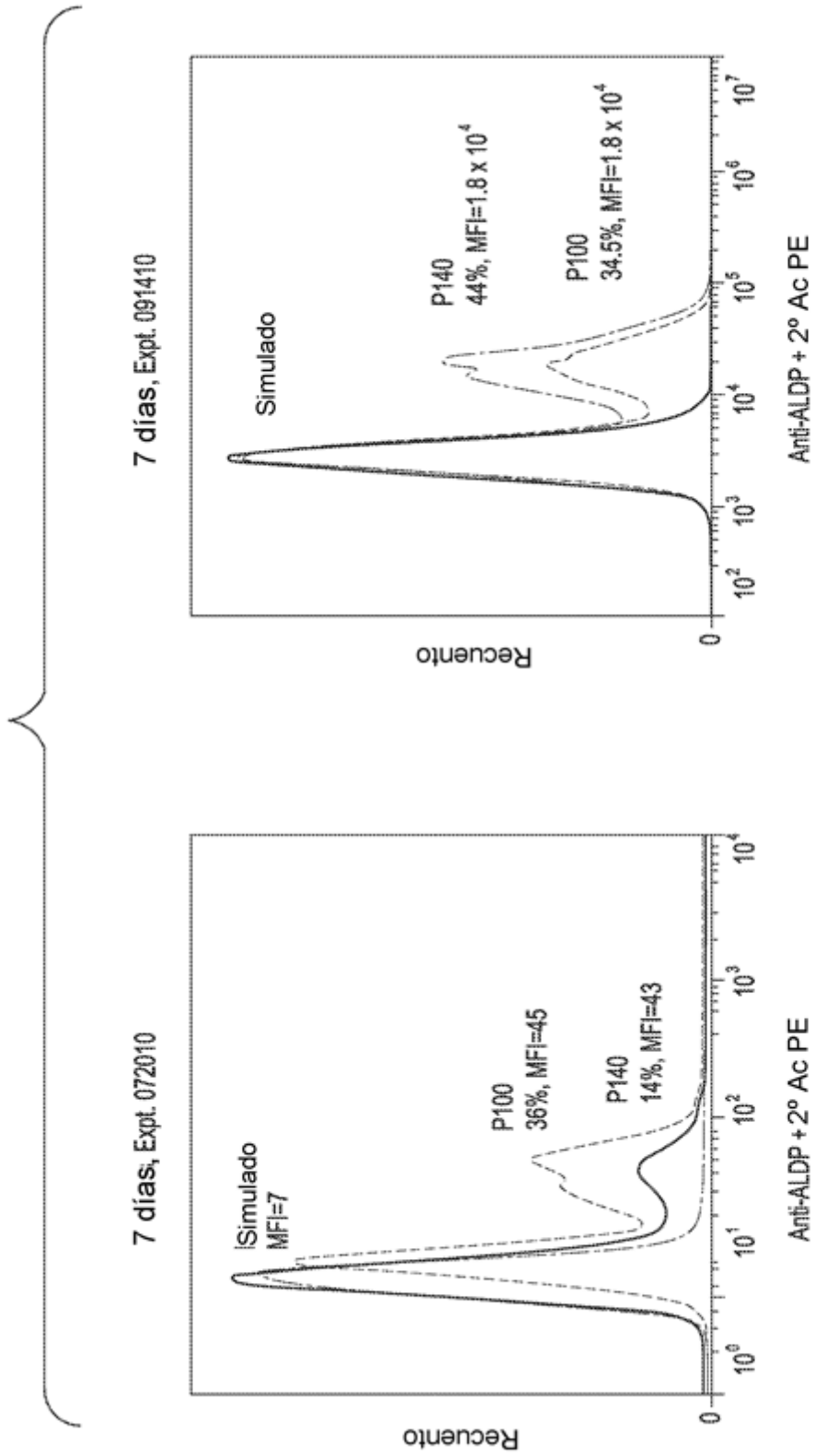


FIG. 8A1

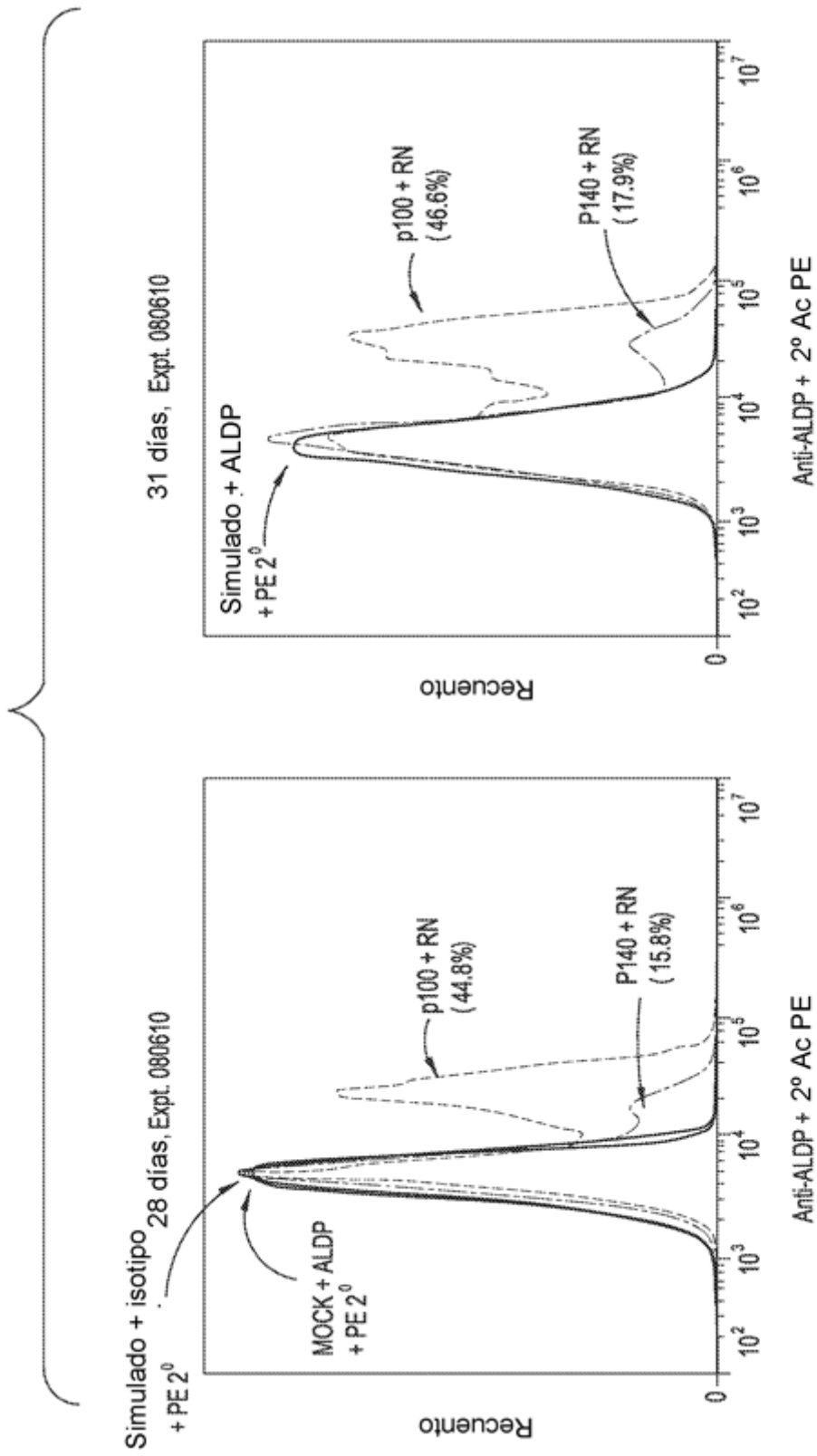


FIG. 8A2

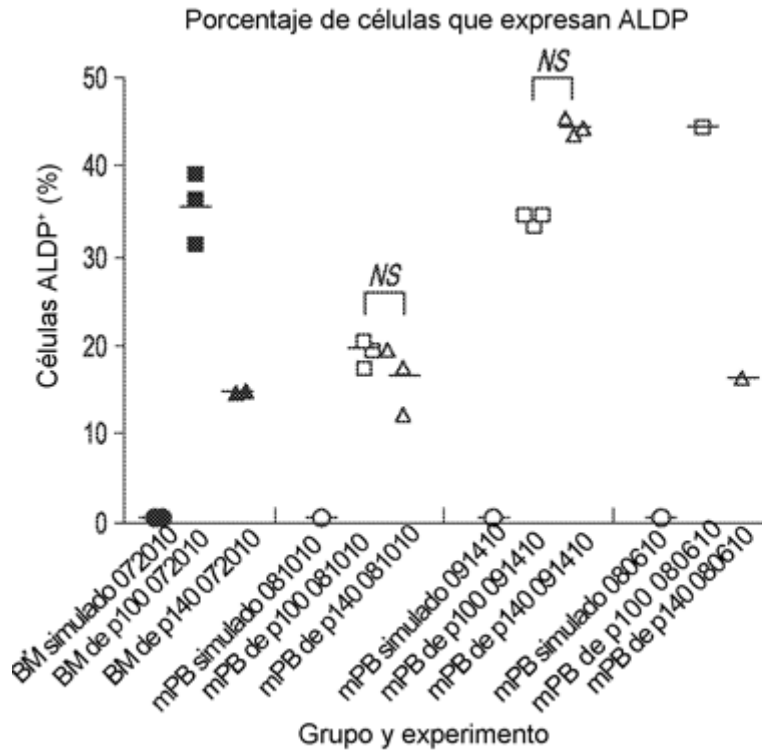


FIG. 8B

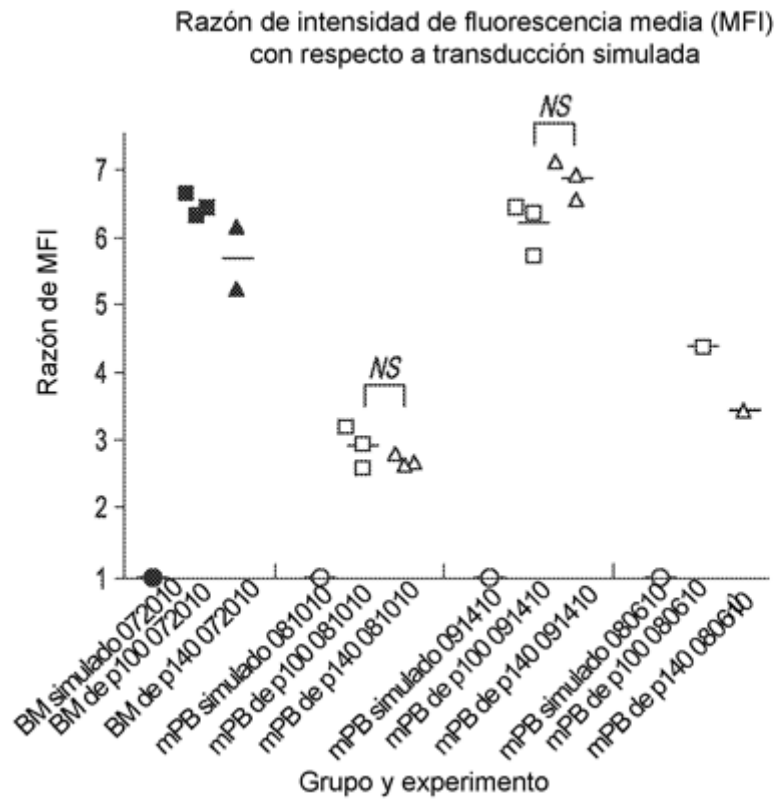


FIG. 8C



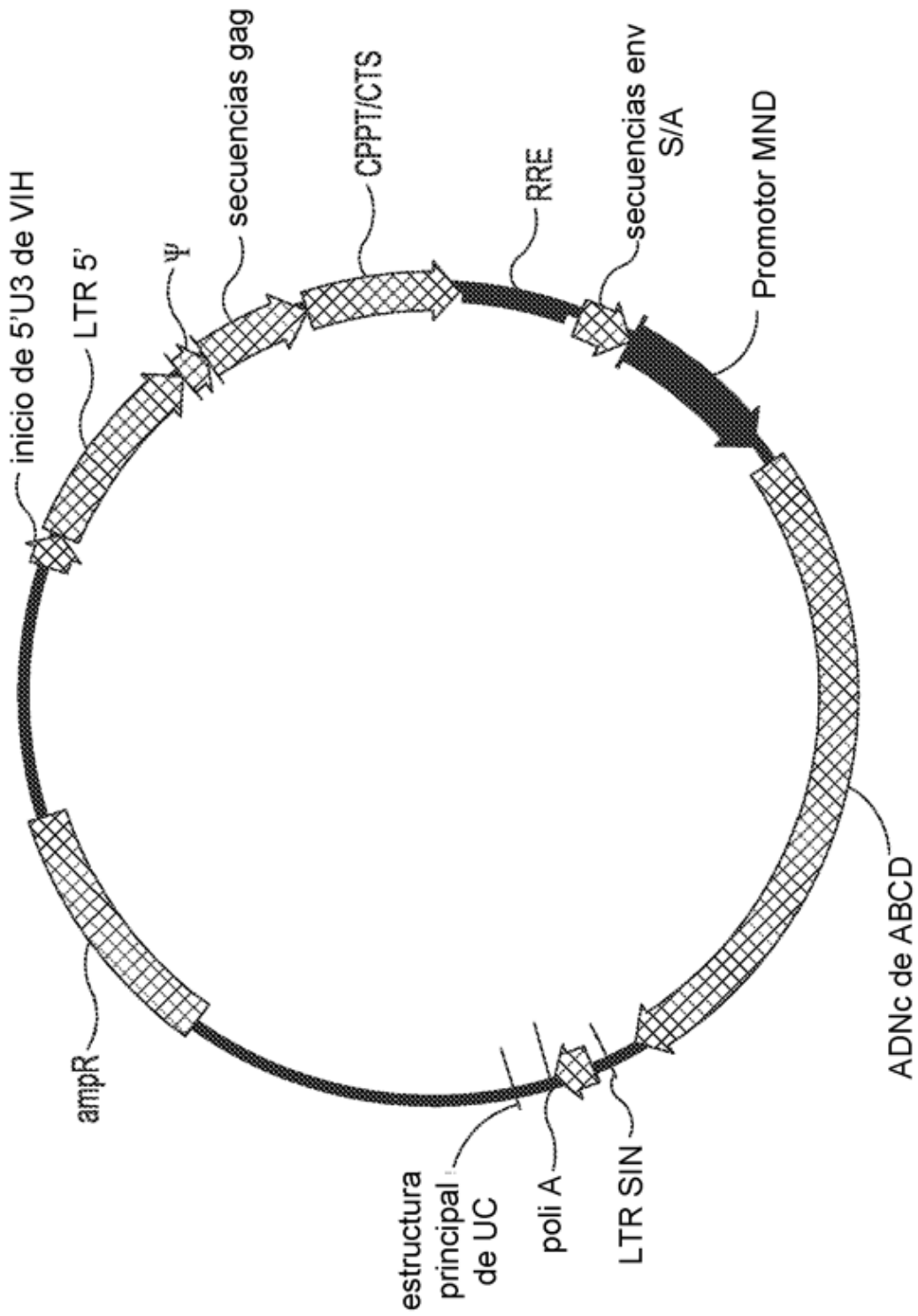
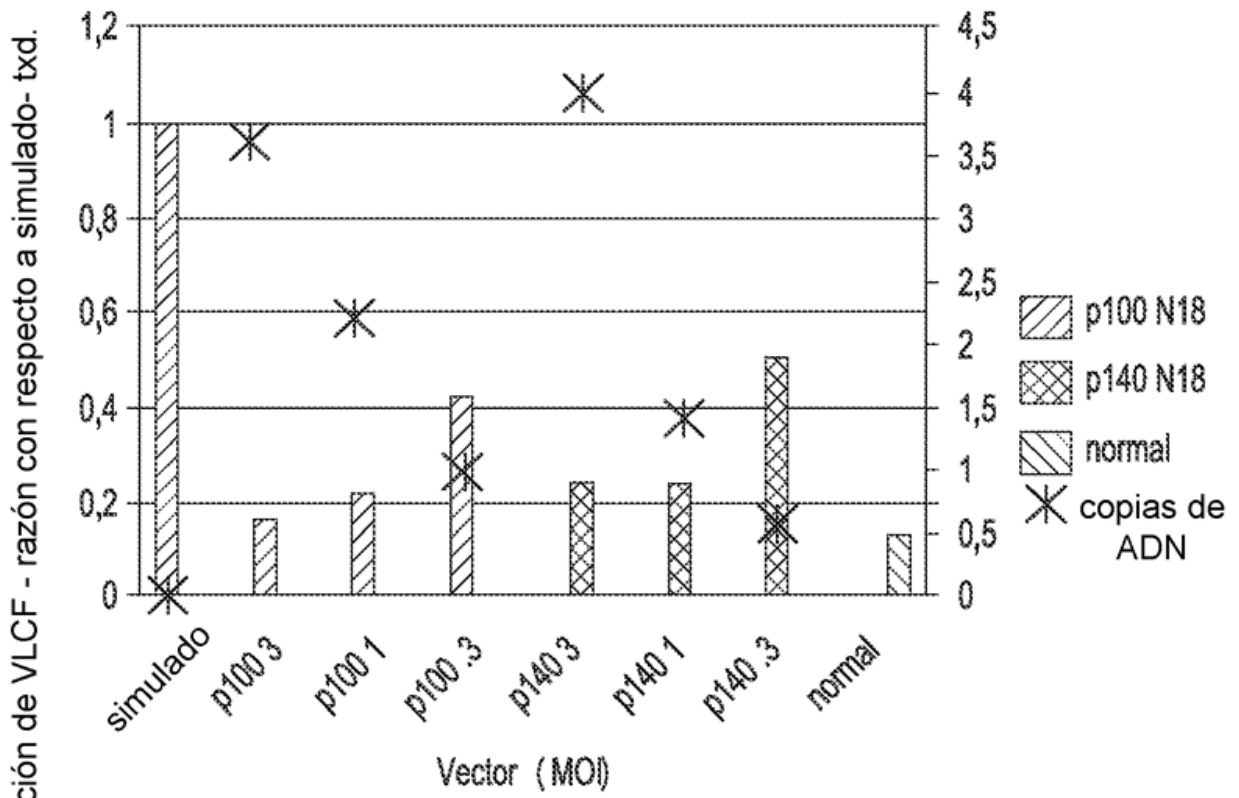


FIG. 9



**FIG. 10**