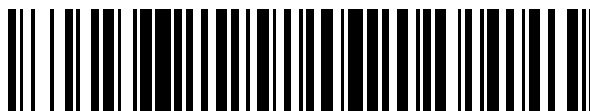


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 724 122**

51 Int. Cl.:

C12N 15/864 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.04.2010** **PCT/US2010/032943**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.11.2010** **WO10127097**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.04.2010** **E 10716723 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.02.2019** **EP 2425000**

54 Título: **Composiciones para dirigir células de las vías respiratorias de conducción que comprenden construcciones de virus adenoasociado**

30 Prioridad:

30.04.2009 US 174149 P

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

06.09.2019

73 Titular/es:

**THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF
PENNSYLVANIA (100.0%)
3160 Chestnut Street Suite 200
Philadelphia, PA 19104, US**

72 Inventor/es:

**BELL, CHRISTIE L. y
WILSON, JAMES M.**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 724 122 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

Composiciones para dirigir células de las vías respiratorias de conducción que comprenden construcciones de virus adenoasociado

Este trabajo se realizó en parte mediante la financiación del National Institutes of Health, P01-HL051746. El gobierno de Estados Unidos puede tener determinados derechos en esta invención.

Antecedentes de la invención

El virus adenoasociado (AAV), un miembro de la familia parvovirus, es un virus icosaédrico sin envuelta pequeño con un genoma de ADN lineal monocatenario de 4,7 kilobases (kb) a 6 kb. El AAV se asigna al género, *Dependovirus*, porque el virus se descubrió como un contaminante en soluciones madre de adenovirus purificadas. El ciclo de vida del AAV incluye una fase latente en que los genomas de AAV, después de la infección, se integran en genomas hospedadores y una fase infecciosa en que, después de una infección por adenovirus o virus del herpes simple, los genomas de AAV integrados se rescatan posteriormente, se replican y se empaquetan en virus infecciosos. Las propiedades de ausencia de patogenicidad, amplio rango de hospedador de infectividad, incluyendo células que no están en división e integración hacen que el AAV sea un vehículo de suministro atractivo.

La cápside de un AAV contiene 60 copias (en total) de tres proteínas víricas (VP), VP1, VP2 y VP3, en una relación predicha de 1:1:10, dispuestas con simetría icosaédrica T=1 [H-J Nam, et al., J Virol., 81(22): 12260-12271 (Nov. 2007)]. Las tres VP se traducen desde el mismo ARNm, conteniendo VP1 un dominio de extremo N único además de la secuencia VP2 completa en su región de extremo C [Nam et al., citado anteriormente]. VP2 contiene una secuencia de extremo N adicional además de VP3 en su extremo C. En estructuras cristalinas de rayos X de las cápsides de AAV2 [Q. Xie, et al., Proc Natl. Acad. Sci. USA 99:10405-10410 (2002)] y AAV4 [L. Govindasamy, et al., J. Virol., 80:11556-11570] y todas las demás estructuras determinadas para cápsides de parvovirus, se observan únicamente la secuencia polipeptídica de extremo C de las proteínas de la cápside de AAV (~530 aminoácidos). La región única de extremo N de VP1, la región solapante de VP1-VP2 y los primeros 14 a 16 restos del extremo N de VP3 están desordenados [L. Govindasamy, et al., y Q. Xie et al., citado anteriormente]. La microscopía crioelectrónica y los datos de reconstrucción de imágenes sugieren que en cápsides de AAV intactas, las regiones de extremo N de las proteínas VP1 y VP2 están localizadas dentro de la cápside [E. Padron, et al., J. Virol. 79:5047-5058 (2005); Q. Xie et al., citado anteriormente] y son inaccesibles para el receptor y la unión al anticuerpo [S. Kronenberg, et al., J. Virol., 79:5296-5303 (2005)]. Por tanto, se cree que la adhesión del receptor y los fenotipos de transducción se determinan por las secuencias de aminoácidos con el dominio de extremo C común de VP1-VP3 [Nam et al., citado anteriormente]. La región única de VP1 ha demostrado albergar una enzima fosfolipasa A2 funcional necesaria para el escape endosómico durante el tráfico al núcleo después de la adhesión al receptor, además de contener secuencias de localización nuclear para la dirección nuclear [JC Grieger, et al, J. Virol. 80:5199-5210 (2006); F., Sonntag, et al, J. Virol., 80:11040-11054 (2006)].

Durante muchos años, se conocían únicamente seis AAV de diferentes secuencias en la técnica, habiéndose aislado la mayoría como contaminantes de preparaciones de adenovirus en cultivos. Más recientemente, los investigadores han descrito una gran cantidad de AAV de diferentes secuencias obtenidas de tejido [G. Gao, et al., Proc Natl Acad Sci USA, 100(10):6081-6086 (13 de mayo de 2003); documento US-2003-0138772-A1 (24 de julio de 2003)] y caracterizaron estos AAV en diferentes serotipos y clados [G. Gao, et al., J. Virol., 78(12):6381-6388 (junio de 2004); publicación de patente internacional n.º WO 2005/033321]. Se ha informado de que diferentes AAV muestran diferentes eficacias de transfección y también muestran tropismo por diferentes células o tejidos.

El virus adenoasociado de serotipo 6 (AAV6) puede transducir de forma eficaz tanto el epitelio de las vías respiratorias de conducción del pulmón de ratón como cultivos celulares de epitelio de vías respiratorias humanas (HAE). CL Halbert et al., "Adeno-associated virus Type 6 (AAV6) Vectors Mediate Efficient Transduction of Airway Epithelial Cells in Mouse Lungs Compared to That of AAV2 Vectors", J. Virol., 75(14): 6615-6624 (julio de 2001). Véase también, CL Halbert et al., J Virol, 74(3): 1524-1532 (feb. 2000) (que compara diversos pseudotipos de AAV2/6, AAV2/3 y AAV2) y EA Rutledge et al., J Virol, 72(1): 309-319 (ene. 1998) (que compara clones infecciosos de AAV6, AAV2, AAV3 y AAV4). También se han evaluado las eficacias de transducción de vectores basados en varias secuencias de AAV nuevas en epitelio de vías respiratorias de ratón *in vivo* y epitelio ciliado de vías respiratorias humanas *in vitro*. [MP Limberis et al., Molecular Therapy, 17(2):294-301 (feb. 2009).] Aunque tres vectores mostraron transducción eficaz en el pulmón de ratón, la alta transducción observada en ratón fue reproducible en las células humanas para únicamente dos de los vectores.

El suministro de genes terapéuticos al epitelio de vías respiratorias enfermas *in vivo* es una opción prometedora para tratamiento genético de diversas enfermedades pulmonares que incluyen enfermedad de las vías respiratorias de fibrosis quística (CF), deficiencia de α -1-antitripsina (AAT), enfermedad pulmonar obstructiva crónica e hipertensión pulmonar [MK Aneja y C Rudolph, Curr Opin Mol Ther, 8: 432-438 (2006); PE Cruz et al., Pharmacogenomics, 8: 1191-1198 (2007); TR Flotte et al., Mol Ther, 15: 229-241 (2007)]. Sin embargo, actualmente, sigue siendo elusivo un vector terapéutico seguro y eficaz.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un péptido aislado que permite la modificación de cápsides de AAV para dirigirse preferentemente a las células de las vías respiratorias de conducción del pulmón, así como las células epiteliales alveolares, en preferencia a otras células no pulmonares.

En un aspecto, la invención proporciona una cápside de AAV artificial que comprende un péptido dirigido a células de las vías respiratorias de conducción del fragmento de aminoácidos que abarca la región IV del bucle variable y la región V del bucle variable de una cápside de AAV de clado A, teniendo dicho péptido la secuencia del aminoácido 447 a 521 de la SEQ ID NO: 1, flanqueada por secuencias de cápside de AAV precursor que es de un clado diferente al clado A, en la que el péptido dirigido a células de conducción de las vías respiratorias es heterólogo a la cápside de AAV precursora, en el que la ubicación de la regiones de bucle variable es como se representa en la figura 2, en la que el péptido dirigido a células de conducción de las vías respiratorias está ubicado en la ubicación nativa de regiones de bucle variable correspondientes de la secuencia de cápside, cuyas regiones de bucle variable correspondientes se han eliminado. En una realización, la cápside de clado A se selecciona de AAV1, AAV6 y hu48R3.

En otro aspecto, la invención proporciona un vector de AAV que comprende una cápside artificial como se describe y un casete de expresión empaquetado en la cápside, en el que dicho casete de expresión comprende al menos una secuencia de repetición terminal invertida de AAV y un gen heterólogo unido de forma funcional a secuencias reguladoras que permiten la expresión del gen heterólogo en células de las vías respiratorias de conducción.

La invención puede usarse para proporcionar un resto dirigido a las vías respiratorias de conducción que comprende una cápside de AAV artificial como se define, en el que la cápside de AAV artificial está ligada a una molécula para suministro al epitelio de conducción de las vías respiratorias. También se divulga una composición farmacéutica que comprende el resto dirigido a las vías respiratorias y un vehículo fisiológicamente compatible.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método de alteración de la especificidad de un vector de AAV seleccionado de modo que se dirija a células de las vías respiratorias de conducción, comprendiendo dicho método la etapa de proporcionar el AAV con un péptido dirigido a células de conducción de las vías respiratorias de la región IV y V del bucle variable de una cápside de AAV de clado A, teniendo dicho péptido la secuencia del aminoácido 447 a 521 de la SEQ ID NO: 1, en el que el péptido dirigido a células de conducción de las vías respiratorias es heterólogo a la cápside de AAV precursora, en el que la región de cápside de AAV nativa que comprende una región IV y V de bucle variable del AAV seleccionado está anulada. También se divulga un método de alteración de la especificidad de un AAV precursor que no está dirigido de forma nativa a células del epitelio alveolar de conducción para proporcionarle capacidad de abordar estas células.

La invención puede usarse para proporcionar una célula hospedadora en cultivo, que comprende una cápside de AAV artificial o un vector de AAV que comprende la misma.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición que comprende un vector de AAV como se describe y un vehículo fisiológicamente compatible.

La invención puede usarse para proporcionar un método de dirección preferente a células de las vías respiratorias de conducción y células del epitelio alveolar en presencia de células no pulmonares. El método implica poner en contacto la célula con un vector de AAV como se describe en este documento.

Se describe específicamente un método para tratar la enfermedad de las vías respiratorias fibrosis quística (CF), deficiencia de α -1-antitripsina (AAT), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) e hipertensión pulmonar suministrando un resto de dirección o un vector de AAV que tiene una cápside artificial como se describe en este documento a un sujeto que lo necesita.

Esta y otras ventajas de la presente invención serán fácilmente evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de la invención.

Breve descripción de los dibujos

La fig. 1A es un esquema de una secuencia de cápside de AAV que muestra las regiones únicas VP1 y VP2 y los nueve dominios de bucle variable putativos. Los intercambios hechos se indican por A-F. La fig. 1B es un diagrama de la generación de fragmentos individuales mediante PCR, con referencia a las regiones identificadas en la fig. 1A. La fig. 1C es un diagrama del corte y empalme por reacciones de prolongación solapante (SOE), que se produjeron entre los fragmentos generados como se ilustra en la fig. 1B en presencia de cebadores externos. La fig. 2 es una alineación de las secuencias de aminoácidos de la cápside de AAV6 [SEQ ID NO: 1] y AAV9 [SEQ ID NO: 2], que ilustran las ubicaciones de vp1, vp2, vp3, ocho hebras de barril β y los nueve dominios de bucle variable I, II, IV, V, VI, VII, VIII y IX.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un péptido aislado que confiere tropismo por las vías respiratorias de conducción a cápsides de AAV que no tienen de forma nativa este tropismo. El péptido de tropismo por las vías aéreas de conducción permite dirigir las cápsides de AAV artificiales al epitelio de las vías respiratorias de conducción, así como al epitelio alveolar en preferencia a células o tejidos no pulmonares. Esto es deseable tanto desde una perspectiva terapéutica como desde una perspectiva de seguridad, porque las construcciones descritas en este documento permiten abordar más específicamente las células enfermas y minimizar o eliminar la transducción de células y tejidos no pulmonares no diana.

La presente invención se refiere a una cápside de virus adenoasociado artificial que comprende un péptido heterólogo dirigido a células de conducción de las vías respiratorias. Este péptido se obtiene de una región de la cápside de AAV incluyendo la región IV del bucle variable y la región V del bucle variable. Como puede observarse fácilmente en la fig. 2, las regiones de bucle variable no están inmediatamente adyacentes entre sí, sino que tienen otras secuencias de cápside de AAV entre medias. De acuerdo con la presente invención, el péptido heterólogo dirigido a células de conducción de las vías respiratorias puede incluir además algunos de los aminoácidos de los AAV de clado A funcionales que están ubicados en el extremo amino de la región IV del bucle variable, pero que son exclusivos de la región III del bucle AAV. Aunque hay aproximadamente 57 aminoácidos en esta región para los AAV del clado A funcionales, el péptido de dirección puede contener ninguno, de uno a cinco aminoácidos o algún otro fragmento en el extremo amino del bucle IV variable. Además, el péptido heterólogo dirigido a células de conducción de las vías respiratorias puede incluir además algunos de los aminoácidos del AAV de clado A funcional que están ubicados en el extremo carboxi del péptido, pero es exclusivo de cualquier aminoácido de la región IV del bucle variable. Aunque hay aproximadamente 13 aminoácidos en esta región entre los bucles V y VI para los AAV del clado A funcionales, el péptido puede contener 0, 1 de 5, o algún otro fragmento de esta región.

En una realización, el AAV del clado A funcional se selecciona de AAV1, AAV6, hu44R2 y hu48R3 [documento WO 2006/110689], todos los cuales comparten una secuencia de aminoácidos idéntica en esta región. Una cápside de AAV artificial contiene este péptido flanqueado por restos de aminoácido en el extremo carboxi y/o amino en el bucle IV variable de AAV y/o la región del bucle V variable que son heterólogos a las secuencias de aminoácidos que flanquean esta región en el AAV precursor.

El péptido dirigido a células de conducción de las vías respiratorias está diseñado en la región del bucle variable correspondiente de una cápside de AAV que es diferente a un AAV del clado A funcional. El resultado es una cápside artificial que tiene tropismo y/o eficacia de transducción por las vías respiratorias de conducción (y, opcionalmente, el epitelio alveolar) que difiere del tropismo del AAV precursor (fuente). Dicha cápside artificial puede generarse por una diversidad de técnicas.

Como se usa en este documento, la "cápside de AAV precursora" se refiere a la cápside que tiene su tropismo nativo modificado por el péptido heterólogo dirigido a células de conducción de las vías respiratorias como se describe en este documento. La fuente de las secuencias de cápside de AAV precursor es un AAV fuera del clado A, ya que muchos de los miembros de este clado han demostrado algún nivel de tropismo por las vías respiratorias de conducción. Los AAV del clado A funcionales incluyen AAV6, AAV 1, hu44R2 y hu48R3. Otros AAV del clado A incluyen hu.44, hu.46, hu.43 y hu.48, entre otros [documento WO 2005/033321 y documento WO 2006/110689].

Los otros clados de AAV incluyen clado B (representado por AAV2), clado C (representado por el híbrido AAV2-AAV3), clado D (representado por AAV7), clado E (representado por AAV8) y clado F: (representado por AAV9 humano). Los AAV3, AAV5 y rh32/33 y rh34 descritos previamente son claramente distintos entre sí, pero no se detectaron en el cribado descrito en este documento, y no se han incluido en ninguno de estos clados. Se proporciona análisis adicional de los clados de AAV en G. Gao, et al., J. Virol., 78(12):6381-6388 (junio de 2004) y las publicaciones de patente internacional n.º WO 2004/028817 y WO 2005/033321. El último documento también proporciona secuencias de AAV humanas novedosas.

Sin embargo, en otra realización, las secuencias de cápside precursora son de un AAV que transduce de forma nativa células de las vías respiratorias de conducción a un nivel tal que anula el uso del suministro de AAV como vector o vehículo de cualquier producto terapéutico u otro producto.

El péptido dirigido a las vías respiratorias de conducción se obtiene de la región que incluye la región IV del bucle variable y la región V del bucle variable de un virus adenoasociado del clado A funcional. En una realización, el AAV del clado A funcional se selecciona de AAV1, AAV6, hu44R2 y hu48R3. Con referencia a la numeración de la cápside de AAV6, SEQ ID NO: 1, este péptido corresponde del aminoácido 447 al aminoácido 521 de la cápside de AAV6 de la SEQ ID NO: 1.

Por tanto, en una realización, este péptido de dirección tiene la secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO: 4: NRTQNQSGSAQNKDLLFSRGSFAGMSVQPKNWLPGPCYRQQRVSKTKTDNNNSNFTWTGASKYNLNGRESIINPG. Basándose en la información proporcionada en este documento respecto a las ubicaciones de aminoácidos de AAV6, un experto en la materia puede determinar fácilmente las secuencias correspondientes de otras secuencias de la

cápside de AAV del clado A, alineando las secuencias usando métodos que son conocidos en la técnica y/o por la estructura cristalina de las cápsides.

También se divulgan ejemplos en que el péptido dirigido a las vías respiratorias de conducción tiene de aproximadamente uno a aproximadamente ocho restos truncados desde el extremo amino y/o carboxi del péptido anterior. En otro ejemplo más, el péptido dirigido a células de conducción de las vías respiratorias es un fragmento funcional dentro de esta región, es decir, un fragmento interno de esta región que confiere la dirección deseada. Dicho fragmento puede ser de al menos 65 aminoácidos de longitud, al menos aproximadamente 50 aminoácidos de longitud, al menos aproximadamente 45 aminoácidos de longitud o más corto. Adecuadamente, dichos fragmentos se obtienen de, con referencia a la numeración de la cápside de AAV6 (SEQ ID NO: 1), el bucle IV variable que varía de los aminoácidos 447 a 469, los aminoácidos 447 a 472, los aminoácidos 451 a 469, los aminoácidos 451 a 474. En un ejemplo, estos fragmentos están conectados a secuencias del bucle V variable de un AAV de clado A. Por ejemplo, el bucle V variable puede variar de los aminoácidos 487 a 521 o 489 a 532 del AAV del clado A, o puede ser un fragmento del mismo que confiere la dirección deseada (por ejemplo, 487 a 506; 487 a 510; 489 a 506, 487 a 510). En un ejemplo, el intervalo de la región de los bucles variables IV - V, es decir, los aminoácidos 447 a 510, se usan como péptido dirigido a las vías respiratorias de conducción. En otro ejemplo, se proporcionan fragmentos dentro de los bucles variables IV y V en la construcción quimérica, sin las secuencias de aminoácidos de AAV6 de conexión. En un ejemplo, la construcción quimérica contiene la región V del bucle variable de AAV u otro AAV de clado A en ausencia de otras secuencias de la cápside de AAV6 (por ejemplo, en ausencia de secuencias del bucle IV variable). Basándose en la información proporcionada en este documento respecto a las ubicaciones de aminoácidos de AAV6, un experto en la materia puede determinar fácilmente las secuencias correspondientes de otras secuencias de la cápside de AAV del clado A, alineando las secuencias y/o mediante la estructura cristalina de las cápsides.

En otro ejemplo más, una cápside quimérica contiene la región 5 del bucle variable de AAV6 o un fragmento de la misma tal como se describe en este documento, en una cápside quimérica, en ausencia de otras regiones de bucle variable del AAV de clado A (por ejemplo, AAV6). En un ejemplo adicional más, la cápside quimérica contiene al menos fragmentos de ambas regiones IV y V de bucle variable de AAV6. Basándose en la información proporcionada en este documento respecto a las ubicaciones de aminoácidos de AAV6, un experto en la materia puede determinar fácilmente las secuencias correspondientes de otras secuencias de la cápside de AAV del clado A, alineando las secuencias y/o mediante la estructura cristalina de las cápsides.

El péptido dirigido a las vías respiratorias de conducción puede insertarse en la región correspondiente en la proteína de la cápside del AAV precursor. Dada la información proporcionada en este documento, un experto en la materia puede ubicar fácilmente la región variable correspondiente de otro AAV (por ejemplo, diferente de AAV de clado A). Las regiones variables en este documento son coherentes con la información estructural respecto al AAV8 proporcionada en H-J Nam, et al., J Virol, 81(22):12260-12271 (nov. 2007). Las fig. 1 - 2 en este documento proporcionan dibujos esquemáticos y una alineación ejemplar que incluye la cápside de AAV6. Se han descrito otras alineaciones más de proteínas de cápside [véase, por ejemplo, el documento WO 03/042397 A1 y el documento WO 2005/033321] o pueden prepararse.

Típicamente, cuando se prepara una alineación basándose en la proteína vp1 de la cápside de AAV, la alineación contiene inserciones y eliminaciones que se identifican de este modo con respecto a una secuencia de AAV de referencia (por ejemplo, AAV2 o AAV6) y la numeración de los restos de aminoácidos se basa en una escala de referencia proporcionada para la alineación. Sin embargo, cualquier secuencia de AAV dada puede tener menos restos de aminoácido que la escala de referencia. En la presente invención, cuando se analiza el AAV precursor y las secuencias de la colección de referencia, la expresión "la misma posición" o la "posición correspondiente" se refiere al aminoácido ubicado en el mismo número de resto en cada una de las secuencias, con respecto a la escala de referencia para las secuencias alineadas. Sin embargo, cuando se sacan de la alineación, cada una de las proteínas vp1 de AAV puede tener estos aminoácidos ubicados en diferentes números de resto.

Las alineaciones se realizan usando cualquiera de una diversidad de programas de alineación de múltiples secuencias disponibles al público o en el mercado. Los programas de alineación de secuencias están disponibles para secuencias de aminoácidos, por ejemplo, los programas "Clustal X", "MAP", "PIMA", "MSA", "BLOCKMAKER", "MEME" y "Match-Box". En general, cualquiera de estos programas se usa con ajustes por defecto, aunque un experto en la materia puede alterar estos ajustes según lo necesario. Como alternativa, un experto en la materia puede utilizar otro algoritmo o programa informático que proporcione al menos el nivel de identidad o alineación que se proporciona por los algoritmos y programas mencionados. Véase, por ejemplo, J.D. Thomson et al., Nucl. Acids. Res., "A comprehensive comparison of multiple sequence alignments", 27(13):2682-2690 (1999).

También hay varios algoritmos conocidos en la técnica que pueden usarse para medir la identidad de secuencia de nucleótidos, incluyendo los contenidos en los programas descritos anteriormente. Como otro ejemplo, pueden compararse secuencias polinucleotídicas usando Fasta, un programa en GCG Versión 6.1. Fasta proporciona alineaciones y el porcentaje de identidad de secuencia de las regiones del mejor solapamiento entre secuencias de consulta y de búsqueda. Por ejemplo, el porcentaje de identidad de secuencia entre secuencias de ácidos nucleicos puede determinando usando Fasta con sus parámetros por defecto (un tamaño de palabra de 6 y el factor NOPAM para la matriz de valores) que se proporcionan en GCG Versión 6.1. Asimismo, hay programas disponibles para

realizar alineaciones de aminoácidos. En general, estos programas se usan con los ajustes por defecto, aunque un experto en la materia puede alterar estos ajustes según lo necesario. Como alternativa, un experto en la materia puede utilizar otro algoritmo o programa informático que proporcione al menos el nivel de identidad o alineación que se proporciona por los algoritmos y programas mencionados.

Como se analiza anteriormente, la secuencia peptídica dirigida a las vías respiratorias está ubicada en la ubicación nativa de las regiones de bucle variable correspondientes de la secuencia de cápside heteróloga. Esto puede conseguirse mediante una diversidad de técnicas conocidas para los expertos en la materia incluyendo, por ejemplo, intercambio de las regiones deseadas usando técnicas tales como las ilustradas en los ejemplos de este documento o conocidas en la técnica. Como se ilustra en los siguientes ejemplos, esto implica típicamente escindir las regiones de bucle variable correspondientes de la secuencia de cápside heteróloga. Sin embargo, pueden usarse otras técnicas adecuadas incluyendo, por ejemplo, técnicas de mutagénesis dirigida al sitio convencionales en el codón del aminoácido a alterar. Típicamente, la mutagénesis dirigida al sitio se realiza usando unas pocas etapas necesarias para obtener el codón deseado para el resto de aminoácido conservado. Dichos métodos son bien conocidos para los expertos en la materia y pueden realizarse usando métodos publicados y/o kits disponibles en el mercado [por ejemplo, disponibles en Stratagene y Promega]. La mutagénesis dirigida al sitio puede realizarse en la secuencia genómica de AAV. La secuencia de AAV puede transportarse mediante un vector (por ejemplo, una estructura principal plasmídica) por conveniencia. Como alternativa, un experto en la materia puede alterar el AAV precursor usando otras técnicas conocidas para los expertos en la materia, por ejemplo, insertando un péptido sintetizado químicamente, y similares.

En cápsides de acuerdo con la invención, las regiones de bucle variable se han eliminado funcionalmente. Opcionalmente, un espaciador opcional flanquea el extremo carboxi y/o amino del péptido dirigido a las vías respiratorias de conducción variable. En determinadas realizaciones, el espaciador es una secuencia de aminoácidos exógena que no es nativa en el sentido de no producirse en la naturaleza, es decir, que es un polipéptido diseñado o preparado de forma sintética o artificial. Estos espaciadores pueden comprender de uno a cinco aminoácidos que se obtienen de una fuente diferente de una cápside de clado A o una fuente diferente de AAV. En una realización, se hace una eliminación funcional en un bucle variable seleccionado y no se inserta molécula en el mismo. Esto puede desearse por una diversidad de razones, por ejemplo, para acomodar un inserto grande en cualquier parte en la cápside. Dicho AAV funcionalmente eliminado puede utilizarse para producir un virión de AAV, así como para otros usos.

Mediante la construcción de la invención, se altera el tropismo nativo del AAV o cápside de AAV. Por tanto, por "tropismo alterado" se entiende que la cápside de AAV o vector de AAV modificado muestra una especificidad de unión a célula diana que está alterada, o es diferente, a la del virus de tipo silvestre del que se obtiene. Por tanto, en una realización, la invención proporciona un método de alteración de la especificidad de un vector de AAV seleccionado de modo que se dirija a células de las vías respiratorias de conducción, proporcionando un péptido heterólogo dirigido a células de conducción de las vías respiratorias como se describe en este documento. El péptido de dirección puede conferir además la capacidad de abordar epitelio alveolar.

En una realización, las secuencias de la cápside se proporcionan mediante una única fuente de AAV. Los AAV adecuados pueden seleccionarse entre AAV que no transducen de forma normal células de las vías respiratorias de conducción con ninguna eficacia, incluyendo, por ejemplo, AAV9, AAV5, AAV2, AAV8 y AAVrh32.22. Otros AAV más pueden seleccionarse fácilmente entre aquellos que se han descrito [documento WO 03/042397 A1; documento WO 2005/033321; documento WO 2006/110689], y particularmente, los AAV que están fuera del clado A. Como alternativa, la cápside de AAV puede obtenerse de más de un AAV.

En una realización, la cápside de AAV seleccionada carece de un motivo de unión a heparina. El AAV puede estar desprovisto de forma natural de un motivo de unión a heparina, o el motivo de unión a heparina puede anularse usando métodos tales como los descritos en el documento WO 2008/027084. Pueden hacerse otras modificaciones más a las secuencias de AAV de tipo silvestre, por ejemplo, para potenciar la producción, rendimiento y/o recuperación de la proteína de cápside artificial o un vector de AAV que tiene la proteína de cápside artificial.

El término "funcional" se refiere a un producto (por ejemplo, una proteína o péptido) que realiza su función nativa, aunque no necesariamente al mismo nivel que el producto nativo. El término "funcional" también puede referirse a un gen que codifica un producto y del que puede expresarse un producto deseado. Una "eliminación funcional" se refiere a una eliminación que destruye la capacidad del producto de realizar su función nativa.

Salvo que se especifique de otro modo (como anteriormente), el término fragmentos incluye péptidos de al menos 8 aminoácidos de longitud, al menos 15 aminoácidos de longitud, al menos 25 aminoácidos de longitud. Sin embargo, pueden utilizarse fácilmente fragmentos de otras longitudes deseadas dependiendo del contexto deseado. Dichos fragmentos pueden producirse de forma recombinante o por otro medio adecuado, por ejemplo, por síntesis química.

La expresión "porcentaje (%) de identidad" puede determinarse fácilmente para secuencias de aminoácidos, sobre la longitud completa de una proteína, o un fragmento de la misma. Adecuadamente, un fragmento es de al menos aproximadamente 8 aminoácidos de longitud, y puede ser de hasta aproximadamente 700 aminoácidos. En general, cuando se hace referencia a "identidad", "homología" o "similitud" entre dos virus adenoasociados diferentes,

"identidad", "homología" o "similitud" se determina en referencia a secuencias "alineadas". Secuencias "alineadas" o "alineaciones" se refieren a múltiples secuencias de ácido nucleico o secuencias proteínicas (de aminoácidos), que a menudo contienen correcciones para bases o aminoácidos perdidos o adicionales en comparación con una secuencia de referencia.

Como se usa en toda esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones, los términos "comprender" y "contener" y sus variantes incluyendo, "comprende", "comprendiendo", "contiene" y "conteniendo", entre otras variantes, son inclusivos de otros componentes, elementos, números enteros, etapas y similares. La expresión "consiste en" o "que consiste en" es exclusiva de otros componentes, elementos, números enteros, etapas y similares.

Resto dirigido a las vías pulmonares/respiratorias de conducción

En una realización, la invención proporciona una cápside de AAV artificial que es una "cápside vacía", es decir, una cápside que no contiene secuencias funcionales empaquetadas en la misma. En otras palabras, la cápside carece de un genoma vírico de AAV y/o no contiene casetes de expresión. En una realización, la cápside de AAV artificial no tiene secuencias de AAV funcionales empaquetadas en la misma. En otra realización, el AAV no contiene secuencias codificantes de genes de AAV funcionales y ningún casete de expresión endógeno o heterólogo.

Una cápside de AAV "vacía" puede usarse como proteína de dirección para una molécula heteróloga. Una molécula terapéutica o inmunogénica deseada u otra molécula puede estar asociada con una cápside de AAV artificial de la invención mediante una secuencia "conectora".

En una realización, la reticulación química entre la cápside de AAV y la molécula es mediante enlace covalente o no covalente. Sin embargo, pueden utilizarse otras parejas de unión de afinidad, como se sabe en la técnica. Se contemplan otras químicas de conjugación adicionales conocidas en la técnica y pueden usarse en realizaciones en este documento, incluyendo, aunque sin limitación, polietilenglicol (PEG) activado, reticulantes basados en éster de maleimida o succinimida o reticulantes bifuncionales de SATA-SMCC, entre otros enlaces conocidos para los expertos en la materia. En una realización adicional, la molécula de interés puede ligarse a la cápside de AAV vacía mediante un conector de PEG ("espaciador"), como se describe en Destito, et al., Chem Biol, octubre de 2007; 14(10): 1152-1162 (2007) y Oh, et al., Bioconj Chem 2006; 17:721-727 (2006).

En otra realización, la molécula de interés se adhiere mediante modificación química de restos de lisina superficiales de AAV usando ésteres de N-hidroxisuccinimida (NHS) o grupos sulfhidrilo usando reactivos de maleimida y haloacetamida, como se describe en Chatterji, et al., Bioconj Chem; 15:807-813 (2004). En otra realización más, los grupos carboxilato superficiales se modifican para adhesión específica.

En otra realización, la molécula de interés puede ligarse a una cápside de AAV mediante un dominio de unión de AAV en una molécula de inmunoglobulina. En realizaciones adicionales, el dominio de unión puede ser un fragmento Fab, Fab', (Fab')₂ o un Fv de una molécula de inmunoglobulina. El dominio de unión puede ligarse a la molécula de interés por cualquier medio conocido, incluyendo los indicados anteriormente. En una realización, se incorpora un conector de PEG entre el dominio de unión y la molécula de interés.

Dichas técnicas de construcción para la incorporación de ADN o secuencias de aminoácidos, mediante adhesión a una secuencia conectora, son conocidas en la técnica y están dentro de las habilidades habituales de un técnico de ingeniería proteínica/genética.

Las moléculas útiles para unión a una cápside de AAV y suministro a las células diana pueden incluir aquellas que son útiles para tratar afecciones tales como, por ejemplo, fibrosis quística, deficiencia de α -1-antitripsina (AAT), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), hipertensión pulmonar, asma, cáncer pulmonar. Los ejemplos de moléculas adecuadas pueden incluir vectores de base no vírica (por ejemplo, plásmidos, "ADN desnudo", cósmidos, etc.) que portan ácidos nucleicos que expresan productos génicos. Los ejemplos de productos génicos adecuados incluyen aquellos descritos a continuación en relación con los casetes de expresión. Adicionalmente, pueden usarse otras moléculas sin base de ácido nucleico en esta realización, incluyendo, por ejemplo, esteroides, derivados de esteroide, moléculas inmunomoduladoras, enzimas, proteínas, moléculas pequeñas y otros restos químicos.

En otra realización, la cápside de AAV artificial que contiene la secuencia heteróloga dirigida a células de conducción de las vías respiratorias se usa en la producción de un vector que tiene empaquetado en el mismo un casete de expresión que suministra un producto a las células diana.

Vectores de AAV con cápsides de AAV artificiales que contienen dominio dirigido a las vías respiratorias de conducción

La invención posibilita un método de generación de un virus adenoasociado (AAV) recombinante que tiene una cápside de AAV novedosa de la invención. Dicho método implica cultivar una célula hospedadora que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de la cápside de AAV novedosa de la invención, o fragmento de la misma, como se define en este documento; un gen rep funcional; un casete de expresión compuesto de, como mínimo,

repeticiones terminales invertidas (ITR) de AAV y un transgén; y suficientes funciones auxiliares para permitir el empaquetado del casete de expresión en la proteína de la cápside de AAV.

Los componentes que se requiere cultivar en la célula hospedadora para empaquetar un casete de expresión de AAV en una cápside de AAV pueden proporcionarse a la célula hospedadora en *trans*. Como alternativa, uno o más de los componentes requeridos (por ejemplo, casete de expresión, secuencias *rep*, secuencias *cap* y/o funciones auxiliares) pueden proporcionarse por una célula hospedadora estable que se ha genomanipulado para que contenga uno o más de los componentes requeridos usando métodos conocidos para los expertos en la materia. Muy adecuadamente, dicha célula hospedadora estable contendrá el componente o componentes requeridos bajo el control de un promotor inducible. Sin embargo, el componente o componentes requeridos pueden estar bajo el control de un promotor constitutivo. Los ejemplos de promotores inducibles y constitutivos adecuados se proporcionan en este documento, en el análisis de elementos reguladores adecuados para su uso con el transgén. En otra alternativa más, una célula hospedadora estable seleccionada puede contener uno o más componentes seleccionados bajo el control de un promotor constitutivo y otro u otros componentes seleccionados bajo el control de uno o más promotores inducibles. Por ejemplo, puede generarse una célula hospedadora estable que se obtiene de células 293 (que contienen funciones auxiliares E1 bajo el control de un promotor constitutivo), pero que contiene las proteínas *rep* y/o *cap* bajo el control de promotores inducibles. Pueden generarse otras células hospedadoras estables adicionales por un experto en la materia.

El casete de expresión, las secuencias *rep*, las secuencias *cap* y las funciones auxiliares requeridas para producir el rAAV de la invención pueden suministrarse a la célula hospedadora de empaquetamiento en forma de cualquier elemento genético que transfiera las secuencias portadas en la misma. El elemento genético seleccionado puede administrarse por cualquier método adecuado, incluyendo los descritos en este documento. Los métodos usados para construir cualquier realización de esta invención son conocidos por los expertos en la manipulación de ácidos nucleicos e incluyen ingeniería genética, ingeniería recombinante y técnicas sintéticas. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY. Asimismo, los métodos de generación de viriones de rAAV son bien conocidos y la selección de un método adecuado no es una limitación en la presente invención. Véase, por ejemplo, K. Fisher et al., *J. Virol.*, 70:520-532 (1993) y la patente de Estados Unidos n.º 5.478.745.

Salvo que se especifique de otro modo, las ITR de AAV, y otros componentes de AAV seleccionados descritos en este documento pueden seleccionarse fácilmente de cualquier AAV, incluyendo, sin limitación, AAV2, AAV7, AAV9 u otras secuencias de AAV [por ejemplo, documento WO 03/042397 A1; documento WO 2005/033321; documento WO 2006/110689]. Estas ITR u otros componentes de AAV pueden aislarse fácilmente usando técnicas disponibles para los expertos en la materia de una secuencia de AAV. Dicho AAV puede aislarse u obtenerse de fuentes académicas, comerciales o públicas (por ejemplo, la American Type Culture Collection, Manassas, VA). Como alternativa, las secuencias de AAV pueden obtenerse mediante medios sintéticos u otros medios adecuados por referencia a secuencias publicadas tales como las que están disponibles en la bibliografía y en bases de datos tales como, por ejemplo, GenBank®, PubMed® o similares.

A. El casete de expresión

El casete de expresión está compuesto de, como mínimo, al menos una secuencia de repetición terminal invertida de AAV, un transgén y sus secuencias reguladoras. En una realización, tanto las repeticiones terminales invertidas (ITR) de AAV 5' como las ITR 3' se incluyen en el casete de expresión. En una realización deseable, el casete de expresión contiene ITR de una secuencia de AAV diferente de aquella que proporciona secuencias de la cápside de AAV. Por ejemplo, pueden usarse vectores pseudotipados que contienen 2 ITR de AAV por conveniencia. Sin embargo, pueden seleccionarse las ITR de otras fuentes adecuadas. Es este casete de expresión el que se empaqueta en una proteína de la cápside y se suministra a una célula hospedadora seleccionada.

1. El transgén

El transgén es una secuencia de ácido nucleico, heteróloga para las secuencias del vector que flanquean el transgén, que codifica un polipéptido, péptido, proteína, enzima u otro producto de interés. En una realización, el casete de expresión porta una secuencia de ácido nucleico, por ejemplo, un ARN. Las moléculas de ARN deseables incluyen ARNt, ARNbc, iARN, ARN ribosómico, ARN catalíticos, ARNip, ARN de horquilla pequeña, ARN de corte y empalme en *trans* y ARN de antisentido. Un ejemplo de una secuencia de ARN útil es una secuencia que inhibe o anula la expresión de una secuencia de ácido nucleico diana en el animal tratado. Típicamente, las secuencias diana adecuadas incluyen dianas oncológicas y enfermedades víricas. Esto puede ser útil, por ejemplo, para tratamientos y vacunas contra el cáncer.

La secuencia codificante de ácido nucleico está unida de forma funcional a componentes reguladores de una manera que permite la transcripción del transgén, su traducción y/o expresión en una célula hospedadora.

Aunque pueden suministrarse muchos productos usando las construcciones de la invención, la invención es particularmente muy adecuada para el suministro de productos útiles en diagnóstico, tratamiento y vacunación de

afecciones asociadas con células de las vías respiratorias de conducción y mejora de los síntomas de las mismas. Dichas afecciones incluyen, sin limitación, fibrosis quística, deficiencia de α -1-antitripsina (AAT), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) e hipertensión pulmonar. Los productos génicos adecuados pueden incluir una secuencia del regulador transmembranario de fibrosis quística (CFTR) funcional, α -1-antitripsina, inhibidor de leucoproteasa secretora, proteína C tensioactiva (SPC), proteína D tensioactiva (SPD) e inmunomoduladores tales como, por ejemplo, interleucinas tales como interleucina-12, factor estimulador de colonias de macrófagos granulocitos (GM-CSF), interferones tales como interferón- β y timidina cinasa del virus del herpes simple (HSV-TK). Otros productos génicos pueden incluir agentes terapéuticos contra el cáncer incluyendo, por ejemplo, p53, FUS1, ARN, incluyendo iARN, entre otros. Otros productos de expresión adecuados más pueden seleccionarse fácilmente por un experto en la materia.

2. Elementos reguladores

Además de los elementos principales identificados anteriormente para el casete de expresión, el vector también incluye elementos de control convencionales que están unidos de forma funcional al transgén de una manera que permite su transcripción, traducción y/o expresión en una célula transfectada con el vector plasmídico o infectada con el virus producido por la invención. Como se usa en este documento, las secuencias "unidas de forma funcional" incluyen tanto secuencias de control de la expresión que están contiguas al gen de interés como secuencias de control de la expresión que actúan en trans o a distancia para controlar el gen de interés.

Las secuencias de control de la expresión incluyen secuencias apropiadas de inicio de la transcripción, de terminación, promotoras y potenciadoras; señales eficaces del procesamiento de ARN tales como señales de corte y empalme y poliadenilación (poliA); secuencias que estabilizan el ARNm citoplásmico; secuencias que potencian la eficacia de traducción (es decir, secuencia consenso Kozak); secuencias que potencian la estabilidad de la proteína; y cuando se desea, secuencias que potencian la secreción del producto codificado. Se conoce en la técnica y pueden utilizarse una gran cantidad de secuencias de control de la expresión, incluyendo promotores que son nativos, constitutivos, inducibles y/o específicos de tejido.

Los ejemplos de promotores constitutivos incluyen, sin limitación, el promotor LTR del virus del sarcoma de Rous (RSV) retroviral (opcionalmente con el potenciador de RSV), el promotor de citomegalovirus (CMV) (opcionalmente con el potenciador de CMV) [véase, por ejemplo, Boshart et al., Cell, 41:521-530 (1985)], el promotor de SV40, el promotor de dihidrofolato reductasa, el promotor de β -actina, el promotor de fosfoglicerol cinasa (PGK) y el promotor de EF1 [Invitrogen]. Los promotores inducibles permiten la regulación de la expresión génica y pueden regularse por compuestos aportados de forma exógena, factores ambientales tales como la temperatura, o la presencia de un estado fisiológico específico, por ejemplo, fase aguda, un estado de diferenciación particular de la célula o en células en replicación únicamente. Los promotores inducibles y sistemas inducibles están disponibles de una diversidad de fuentes comerciales, incluyendo, sin limitación, Invitrogen, Clontech y Ariad. Se han descrito otros muchos sistemas y pueden seleccionarse fácilmente por un experto en la materia. Ejemplos de promotores inducibles regulados por compuestos aportados de forma exógena incluyen, el promotor de la metalotionina (MT) de oveja inducible con cinc, el promotor del virus del tumor mamario de ratón (MMTV) inducible por dexametasona (Dex), el sistema promotor de la polimerasa T7 [publicación de patente internacional n.º WO 98/10088]; el promotor de la ecdisona de insecto [No et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:3346-3351 (1996)], el sistema reprimible por tetraciclina [Gossen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551 (1992)], el sistema inducible por tetraciclina [Gossen et al., Science, 268:1766-1769 (1995), véase también Harvey et al., Curr. Opin. Chem. Biol., 2:512-518 (1998)], el sistema inducible por RU486 [Wang et al., Nat. Biotech., 15:239-243 (1997) y Wang et al., Gene Ther., 4:432-441 (1997)] y el sistema inducible por rapamicina [Magari et al., J. Clin. Invest., 100:2865-2872 (1997)]. Otros tipos de promotores inducibles que pueden ser útiles en este contexto son aquellos que están regulados por un estado fisiológico específico, por ejemplo, temperatura, fase aguda, un estado de diferenciación particular de la célula o en células en replicación únicamente.

En otra realización, se usará el promotor nativo para el transgén. El promotor nativo puede preferirse cuando se desea que la expresión del transgén imite la expresión nativa. El promotor nativo puede usarse cuando la expresión del transgén debe estar regulada de forma temporal o en el desarrollo, o de una manera específica de tejido, o en respuesta a estímulos transcripcionales específicos. En una realización adicional, también pueden usarse otros elementos de control de la expresión nativos, tales como elementos potenciadores, sitios de poliadenilación o secuencias consenso Kozak para imitar la expresión nativa.

Otra realización del transgén incluye un gen unido de forma funcional a un promotor específico de tejido. Por ejemplo, pueden usarse promotores específicos de tejido pulmonar y, cuando estén disponibles, específicos para las células de las vías respiratorias de conducción. Ejemplos de dichos promotores pueden incluir, por ejemplo, el promotor de la secuencia de forkhead J1 (FOXJ1), el promotor de la poliubiquitina UbC, el promotor del factor de transcripción ETS que contiene dominio dirigido a SAM (SPDEF), el promotor de la proteína secretora de células Clara/utero globina (CCSP/UG), entre otros. Otros promotores de genes específicos de pulmón pueden incluir, por ejemplo, la proteína B tensioactiva B (SPB), la proteína C tensioactiva (SPC) y la proteína A tensioactiva (SPA), el promotor del antígeno carcinoembrionario humano ectogénico (CEA), el factor 1 de transcripción tiroideo (TTF1) y la proteína A1 tensioactiva humana (hSPA1), entre otros.

Opcionalmente, los plásmidos que portan los transgenes terapéuticamente útiles también pueden incluir marcadores de selección o genes indicadores que incluyen secuencias que codifican resistencia a geneticina, higromicina o purimicina, entre otros. Dichos indicadores de selección o genes marcadores (preferiblemente ubicados fuera del genoma vírico a rescatar por el método de la invención) pueden usarse para señalar la presencia de los plásmidos en células bacterianas, tal como resistencia a ampicilina. Otros componentes del plásmido pueden incluir un origen de replicación. La selección de estos y otros promotores y elementos del vector son convencionales y muchas de dichas secuencias están disponibles.

La combinación del transgén, promotor/potenciador e ITR de AAV se menciona como un casete de expresión para facilitar su referencia en este documento. Habiendo proporcionado los contenidos de esta memoria descriptiva, el diseño de dicho casete de expresión puede hacerse recurriendo a técnicas convencionales.

3. Suministro del casete de expresión a una célula hospedadora de empaquetado

El casete de expresión puede transportarse en cualquier vector adecuado, por ejemplo, un plásmido, que se suministra a una célula hospedadora de empaquetado. Los plásmidos útiles en esta invención pueden genomanipularse de modo que sean adecuados para la replicación y, opcionalmente, la integración en células procariotas, células de mamífero o ambas. Estos plásmidos (u otros vectores que portan la ITR de AAV 5'-molécula heteróloga-ITR de AAV 3') contienen secuencias que permiten la replicación del casete de expresión en eucariotas y/o procariotas y marcadores de selección para estos sistemas. Los marcadores de selecciones o genes indicadores pueden incluir secuencias que codifican resistencia a geneticina, higromicina o purimicina, entre otros. Los plásmidos también pueden contener determinados indicadores de selección o genes marcadores que pueden usarse para señalar la presencia del vector en células bacterianas, tal como resistencia a ampicilina. Otros componentes del plásmido pueden incluir un origen de replicación y un amplicón, tal como el sistema de amplicón que emplea el antígeno nuclear del virus de Epstein Barr. Este sistema de amplicón, u otros componentes de amplicón similares, permiten replicación episómica de alta copia en las células. Preferiblemente, la molécula que porta el casete de expresión se transfecta en la célula, donde puede existir de forma transitoria. Como alternativa, el casete de expresión (que porta la ITR de AAV 5'-molécula heteróloga-ITR 3') puede integrarse de forma estable en el genoma de la célula hospedadora, de forma cromosómica o como un episoma. En determinadas realizaciones, el casete de expresión puede estar presente en múltiples copias, opcionalmente en concatámeros cabeza con cabeza, cabeza con cola o cola con cola. Las técnicas de transfección adecuadas son conocidas y pueden utilizarse fácilmente para suministrar el casete de expresión a la célula hospedadora.

En general, cuando se suministra el vector que comprende el casete de expresión por transfección, el vector se suministra en una cantidad de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 100 µg de ADN, de aproximadamente 10 µg a aproximadamente 50 µg de ADN a aproximadamente 1×10^4 células hasta aproximadamente 1×10^{13} células o aproximadamente 1×10^5 células. Sin embargo, las cantidades relativas de ADN del vector a las células hospedadoras puede ajustarse por un experto en la materia, que tienen consideración factores tales como el vector seleccionado, el método de suministro y las células hospedadoras seleccionadas.

B. Secuencias *Rep* y *Cap*

Además del casete de expresión, la célula hospedadora contiene las secuencias que dirigen la expresión de una proteína de cápside de AAV novedosa en la invención (o una proteína de cápside que comprende un fragmento de la misma) en una célula hospedadora y secuencias *rep* de la misma fuente que la fuente de las ITR de AAV encontradas en el casete de expresión, o una fuente de complementación cruzada. Las secuencias *cap* y *rep* de AAV pueden obtenerse independientemente de una fuente de AAV como se describe anteriormente y pueden introducirse en la célula hospedadora de cualquier manera conocida en la técnica como se describe anteriormente. Adicionalmente, cuando se pseudotipa un vector de AAV, las secuencias que codifican cada una de las proteínas *rep* esenciales puede suministrarse por diferentes fuentes de AAV (por ejemplo, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV7, AAV8, AAV9 o una de las otras secuencias de AAV descritas en este documento o conocidas en la técnica). Por ejemplo, las secuencias *rep*78/68 pueden ser de AAV2, mientras que las secuencias *rep*52/40 pueden ser de AAV8.

En un ejemplo, la célula hospedadora contiene de forma estable la proteína de la cápside bajo el control de un promotor adecuado, tales como los descritos anteriormente. De forma más deseable, en este ejemplo, la proteína de la cápside se expresa bajo el control de un promotor inducible. En otro ejemplo, la proteína de la cápside se suministra a la célula hospedadora en *trans*. Cuando se suministra a la célula hospedadora en *trans*, la proteína de la cápside puede suministrarse mediante un plásmido que contiene las secuencias necesarias para dirigir la expresión de la proteína de la cápside seleccionada en la célula hospedadora. De forma más deseable, cuando se suministra a la célula hospedadora en *trans*, el plásmido que porta la proteína de la cápside también porta otras secuencias requeridas para empaquetar el rAAV, por ejemplo, la secuencias *rep*.

En otro ejemplo, la célula hospedadora contiene de forma estable las secuencias *rep* bajo el control de un promotor adecuado, tales como los descritos anteriormente. De forma más deseable, en este ejemplo, las proteínas *rep* esenciales se expresan bajo el control de un promotor inducible. En otro ejemplo, las proteínas *rep* se suministran a las células hospedadoras en *trans*. Cuando se suministran a la célula hospedadora en *trans*, las proteínas *rep* pueden

suministrarse mediante un plásmido que contiene las secuencias necesarias para dirigir la expresión de las proteínas *rep* seleccionadas en la célula hospedadora.

Por tanto, en un ejemplo, las secuencias *rep* y *cap* pueden transfectarse en la célula hospedadora en una única molécula de ácido nucleico y existen de forma estable en la célula como un episoma. En otro ejemplo, las secuencias *rep* y *cap* se integran de forma estable en el cromosoma de la célula. Otro ejemplo tiene las secuencias *rep* y *cap* expresadas de forma transitoria en la célula hospedadora. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico útil para dicha transfección comprende, de 5' a 3', un promotor, un espaciador opcional interpuesto entre el promotor y el sitio de inicio de la secuencia génica de *rep*, una secuencia génica de *rep* de AAV y una secuencia génica de *cap* de AAV.

Opcionalmente, las secuencias *rep* y/o *cap* pueden suministrarse en un vector que contiene otras secuencias de ADN que tienen que introducirse en las células hospedadoras. Por ejemplo, el vector puede contener la construcción de rAAV que comprende el casete de expresión. El vector puede comprender uno o más de los genes que codifican las funciones auxiliares, por ejemplo, las proteínas adenovíricas E1, E2a y E4 ORF6, y el gen para el ARN de VAI.

Preferiblemente, el promotor usado en esta construcción puede ser cualquiera de los promotores constitutivos, inducibles o nativos conocidos para los expertos en la materia o como se analizan anteriormente. En una realización, se emplea la secuencia promotora de P5 de AAV. La selección del AAV para proporcionar cualquiera de estas secuencias no limita la invención.

En otro ejemplo preferido, el promotor para *rep* es un promotor inducible, tal como se analiza anteriormente en relación con los elementos reguladores transgénicos. Un promotor preferido para la expresión de *rep* es el promotor T7. El vector que comprende el gen *rep* regulado por el promotor T7 y el gen *cap*, se transfecta o transforma en una célula que expresa de forma constitutiva o inducible la polimerasa T7. Véase la publicación de patente internacional n.º WO 98/10088, publicada el 12 de marzo de 1998.

El espaciador es un elemento opcional en el diseño del vector. El espaciador es una secuencia de ADN interpuesta entre el promotor y el sitio de inicio ATG del gen *rep*. El espaciador puede tener cualquier diseño deseado; es decir, puede ser una secuencia aleatoria de nucleótidos o, como alternativa, puede codificar un producto génico, tal como un gen marcador. El espaciador puede contener genes que incorporan típicamente sitios de inicio/parada y poliA. El espaciador puede ser una secuencia de ADN no codificante de un procariota o eucariota, una secuencia no codificante repetitiva, una secuencia codificante sin controles transcripcionales o una secuencia codificante con controles transcripcionales. Dos fuentes ejemplares de secuencias espaciadoras son las secuencias de escala del fago λ o las secuencias de escala de levadura, que están disponibles en el mercado, por ejemplo, de Gibco o Invitrogen, entre otros. El espaciador puede ser de cualquier tamaño suficiente para reducir la expresión de los productos génicos *rep78* y *rep68*, que dan lugar a los productos génicos *rep52*, *rep40* y *cap* expresados a niveles normales. La longitud del espaciador, por lo tanto, puede variar de aproximadamente 10 pb a aproximadamente 10,0 kpb, preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 100 pb a aproximadamente 8,0 kpb. Para reducir la posibilidad de recombinación, el espaciador es preferiblemente de menos de 2 kpb de longitud; sin embargo, la invención no está limitada de este modo.

Aunque la molécula o moléculas que proporcionan *rep* y *cap* pueden existir en la célula hospedadora de forma transitoria (es decir, mediante transfección), se prefiere que una o ambas proteínas *rep* y *cap* y el promotor o promotores que controlan su expresión se expresen de forma estable en la célula hospedadora, por ejemplo, como un episoma o por integración en el cromosoma de la célula hospedadora. Los métodos empleados para construir realizaciones de esta invención son técnicas convencionales de ingeniería genética o de ingeniería recombinante tales como las descritas en las referencias anteriores. Aunque esta memoria descriptiva proporciona ejemplos ilustrativos de construcciones específicas, usando la información proporcionada en este documento, un experto en la materia puede seleccionar y diseñar otras construcciones adecuadas, usando una elección de espaciadores, promotores P5 y otros elementos, incluyendo al menos una señal de inicio y parada de la traducción, y la adición opcional de sitios de poliadenilación.

En otro ejemplo, la proteína *rep* o *cap* puede proporcionarse de forma estable por una célula hospedadora.

C. Las funciones auxiliares

La célula hospedadora de empaquetado también requiere funciones auxiliares para empaquetar el rAAV de la invención. Opcionalmente, estas funciones pueden suministrarse por un herpesvirus. De forma más deseable, las funciones auxiliares necesarias se proporcionan cada una a partir de una fuente de adenovirus humano o de primate no humano, tales como las descritas anteriormente y/o están disponibles de una diversidad de fuentes, incluyendo la American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA (US). En un ejemplo actualmente preferido, la célula hospedadora está provista de y/o contiene un producto génico E1a, un producto génico E1b, un producto génico E2a y/o un producto génico E4 ORF6. La célula hospedadora puede contener otros genes adenovíricos tales como ARN de VAI, pero estos genes no son necesarios. En un ejemplo preferido, no hay otros genes o funciones génicas de adenovirus presentes en la célula hospedadora.

Los productos génicos de adenovirus E1a, E1b, E2a y/o E4ORF6, así como cualquier otra función auxiliar deseada, puede proporcionarse usando cualquier medio que permita su expresión en una célula. Cada una de estas secuencias que codifican estos productos puede estar en un vector diferente, o uno o más genes pueden estar en el mismo vector. El vector puede ser cualquier vector conocido en la técnica o divulgado anteriormente, incluyendo plásmidos, cósmidos y virus. La introducción en la célula hospedadora del vector puede conseguirse por cualquier medio conocido en la técnica o como se divulga anteriormente, incluyendo transfección, infección, electroporación, suministro por liposoma, técnicas de fusión de membrana, gránulos recubiertos con ADN a alta velocidad, infección vírica y fusión de protoplastos, entre otros. Uno o más de los genes adenovíricos pueden integrarse de forma estable en el genoma de la célula hospedadora, expresarse de forma estable como episomas o expresarse transitoriamente. Los productos génicos pueden expresarse todos de forma transitoria, en un episoma o integrarse de forma estable, o algunos de los productos génicos pueden expresarse de forma estable mientras que otros se expresan de forma transitoria. Además, los promotores para cada uno de los genes adenovíricos pueden seleccionarse independientemente de un promotor constitutivo, un promotor inducible o un promotor adenovírico nativo. Los promotores pueden regularse por un estado fisiológico específico del organismo o célula (es decir, por el estado de diferenciación o en células en replicación o quiescentes) o por otros medios, por ejemplo, por factores añadidos de forma exógena.

D. Células hospedadoras y líneas celulares de empaquetamiento

La propia célula hospedadora puede seleccionarse de cualquier organismo biológico, incluyendo células procariotas (por ejemplo, bacterianas) y células eucariotas, incluyendo, células de insecto, células de levadura y células de mamífero. Las células hospedadoras particularmente deseables se seleccionan entre cualquier especie de mamífero, incluyendo, sin limitación, células tales como células A549, WEHI, 3T3, 10T1/2, BHK, MDCK, COS 1, COS 7, BSC 1, BSC 40, BMT 10, VERO, WI38, HeLa, 293 (que expresan E1 adenovírico funcional), Saos, C2C12, células L, HT1080, HepG2 y fibroblastos primarios, hepatocitos y células mioblastos derivadas de mamíferos incluyendo ser humano, mono, ratón, rata, conejo y hámster. La selección de la especie de mamífero que proporcionan las células no es una limitación de esta invención; ni tampoco el tipo de célula de mamífero, es decir, fibroblasto, hepatocito, célula tumoral, etc. Los requisitos para célula usada son que no porte ningún gen adenovírico diferente de E1, E2a y/o E4 ORF6; no contenga ningún otro gen vírico que pudiera provocar recombinación homóloga de un virus contaminante durante la producción de rAAV; y tenga capacidad de infectar o transfectar ADN y expresión del ADN transfectado. En un ejemplo preferido, la célula hospedadora es una que tiene *rep* and *cap* transfectados de forma estable en la célula.

Una célula hospedadora útil en la presente invención es una célula hospedadora transformada de forma estable con las secuencias que codifican *rep* y *cap*, y que se transfecta con el ADN de adenovirus de E1, E2a y E4ORF6 y una construcción que porta el casete de expresión como se describe anteriormente. Las líneas celulares que expresan *rep* y/o *cap* estables, tales como B-50 (publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 99/15685), o las descritas en la patente de Estados Unidos n.º 5 658 785, también pueden emplearse de forma similar. Otra célula hospedadora deseable contiene el ADN adenovírico mínimo que es suficiente para expresar E4 ORF6. Otras líneas celulares más pueden construirse usando las secuencias *cap* de AAV corregidas con singulón.

La preparación de una célula hospedadora implica técnicas tales como ensamblaje de secuencias de ADN seleccionadas. Este ensamblaje puede conseguirse utilizando técnicas convencionales. Dichas técnicas incluyen ADNc y clonación genómica, que son bien conocidos y se describen en Sambrook *et al.*, citado anteriormente, uso de secuencias oligonucleotídicas solapantes de los genomas de adenovirus y AAV, combinados con reacción en cadena de la polimerasa, métodos sintéticos y cualquier otro método adecuado que proporcione la secuencia de nucleótidos deseada.

La introducción de las moléculas (como plásmidos o virus) en la célula hospedadora también pueden conseguirse usando técnicas conocidas para los expertos y como se analiza en toda la memoria descriptiva. En ejemplos preferidos, se usan técnicas de transfección convencionales, por ejemplo, transfección con CaPO₄ y electroporación, y/o infección por vectores híbridos de adenovirus/AAV en líneas celulares tales como la línea celular de riñón embrionario humano HEK 293 (una línea celular de riñón humano que contiene genes E1 de adenovirus funcionales que proporciona proteínas E1 de acción en trans).

Composiciones farmacéuticas y uso de las mismas

Se describen en este documento composiciones farmacéuticas que contienen una molécula dirigida a las vías respiratorias, que comprenden una cápside de AAV artificial ligada a un resto para el suministro al epitelio de conducción de las vías respiratorias y un vehículo fisiológicamente compatible. Otras composiciones farmacéuticas contienen un vector AAV que contiene una cápside de AAV artificial como se describe en este documento con un vehículo fisiológicamente compatible. Estas composiciones son muy adecuadas para dirigirse preferentemente a las células de las vías respiratorias de conducción y para dirigirse al epitelio alveolar, en preferencia a células no pulmonares. En una realización, estas composiciones se formulan con un vehículo adecuado para suministro intranasal, oral o intratraqueal. Sin embargo, pueden seleccionarse otros formularios y vías de suministro.

Pueden suministrarse vectores recombinantes que contienen la cápside de AAV artificial a células hospedadoras de acuerdo con métodos publicados. El rAAV, preferiblemente suspendido en un vehículo fisiológicamente compatible,

puede administrarse a un paciente humano o paciente mamífero no humano. Los vehículos adecuados pueden seleccionarse fácilmente por un experto en la materia en vista de la indicación para la que está dirigida el virus de transferencia. Por ejemplo, un vehículo adecuado incluye solución salina, que puede formularse con una diversidad de soluciones tamponantes (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato). Otros vehículos ejemplares incluyen solución salina estéril, lactosa, sacarosa, fosfato de calcio, gelatina, dextrano, agar, pectina, aceite de cacahuete, aceite de sésamo y agua.

Opcionalmente, las composiciones pueden contener, además del AAV y uno o más vehículos, otros ingredientes farmacéuticos convencionales, tales como conservantes o estabilizantes químicos. Los conservantes ejemplares adecuados incluyen clorobutanol, sorbato de potasio, ácido sórbico, dióxido de azufre, galato de propilo, los parabenos, etil vainillina, glicerina, fenol y paraclorofenol. Los estabilizantes químicos adecuados incluyen gelatina y albúmina.

Los vectores o restos que dirigen AAV se administran en cantidades suficientes para proporcionar un beneficio terapéutico sin efectos adversos excesivos, o con efectos fisiológicos médicamente aceptables, que pueden determinarse por los expertos en las materias médicas. Las vías convencionales y farmacéuticamente aceptables de administración incluyen, aunque sin limitación, suministro directo a un órgano deseado (por ejemplo, el pulmón), vía oral, por inhalación, intranasal, intratraqueal, intraarterial, intraocular, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica y otras vías parenterales de administración. Las vías de administración pueden combinarse, si se desea.

Las dosificaciones del vector vírico o resto de dirección dependerán principalmente de factores tales como la afección que se esté tratando, la edad, peso y salud del paciente y, por tanto, pueden variar entre pacientes. Por ejemplo, una dosificación para seres humanos terapéuticamente eficaz del vector vírico en general está en el intervalo de aproximadamente 0,1 ml a aproximadamente 100 ml de solución que contiene concentraciones de aproximadamente 1×10^9 a 1×10^{16} genomas de vector vírico. Una dosificación de seres humanos preferida para suministro a órganos grandes (por ejemplo, hígado, músculo, corazón y pulmón) puede ser de aproximadamente 5×10^{10} a 5×10^{13} genomas de AAV, a un volumen de aproximadamente 1 a 100 ml. Una dosificación preferida para el suministro al ojo es de aproximadamente 5×10^9 a 5×10^{12} copias de genoma, a un volumen de aproximadamente 0,1 ml a 1 ml. Por ejemplo, una dosificación para seres humanos terapéuticamente eficaz de un resto dirigido a células de conducción de las vías respiratorias está en general en el intervalo de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 10 mg del resto. Este puede suministrarse en solución, por ejemplo, en aproximadamente 0,1 ml a aproximadamente 100 ml de solución. Tanto para el vector vírico como el resto de dirección, la dosificación puede ajustarse para equilibrar el beneficio terapéutico frente a cualquier efecto secundario y dichas dosificaciones pueden variar dependiendo de la aplicación terapéutica para la que se emplea el vector recombinante. Los niveles de expresión del transgén y/o la semivida en circulación de una molécula terapéutica o de vacuna pueden controlarse para determinar la frecuencia de dosificación. Opcionalmente, pueden utilizarse pautas posológicas similares a las descritas con fines terapéuticos para inmunización usando las composiciones de la invención.

Se proporcionan a continuación ejemplos de productos terapéuticos y productos inmunógenos para suministro por las construcciones derivadas de AAV de la invención. Estas construcciones pueden usarse para una diversidad de regímenes terapéuticos o de vacuna, como se describe en este documento. Adicionalmente, estos vectores pueden suministrarse en combinación con uno o más vectores diferentes o ingredientes activos en un régimen terapéutico y/o de vacuna deseado.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos son únicamente ilustrativos y no son una limitación de la presente invención.

Ejemplo 1: AAV que tiene cápside quimérica de AAV6/9

A. Construcción de quimera de AAV con regiones IV - V de bucle variables

Los dominios específicos de la cápside de AAV6 y AAV9 se intercambiaron usando corte y empalme por PCR mediante prolongación solapante (fig. 1A-C). Este método implica el uso de cebadores para amplificar las regiones a intercambiar en cada cápside de vector. Estos cebadores se diseñaron para que tuvieran un saliente 5' de 10-15 pares de bases complementarias a la secuencia heteróloga de la cápside de modo que los extremos de los productos de PCR contuvieran secuencias complementarias. Esto permitió que los fragmentos se unieran juntos en una segunda región de PCR usando un conjunto de cebadores complementario a los extremos 5' y 3' exteriores para formar la secuencia de cápside quimérica. F se refiere al cebador directo y R al cebador inverso.

IV-V de VL de AAV6

5' -AGCCTGGACCGRCTATGAATCC -3'
5' - GCCATAGCAGGTCCAGGGTTGAT-3'

F
R

SEQ ID NO: 5
SEQ ID NO: 6

VP1- IV de VL de AAV9

5' - AGACGCGGAAGCTTCGATCAACTAC -3'
5' - GGATTCATYAGYCGGTCCAGGCT -3'

F
R

SEQ ID NO: 7
SEQ ID NO: 8

5 V de VL de AAV9 - fin

5'-ATCAACCCTGGACCTGCTATGGC -3'
5'-ACCTCTAGTCCTGCAGGTTTAAACG -3'

F
R

SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 10

10 Se construyeron doce quimeras, que incluían intercambios de las regiones únicas VP1 y VP2 y las nueve supuestas regiones de bucle variable superficiales de la cápside.

Estas secuencias de cápside quimérica entonces se clonaron en un plásmido que contenía el gen *rep* de AAV2 por digestión del sitio de restricción y después se transfectaron en células 293, junto con un plásmido que contenía GFP expresada a partir de un promotor de citomegalovirus (CMV) y flanqueada por las repeticiones terminales invertidas (ITR) de AAV2 más un plásmido auxiliar AdV. Seis de estos vectores se hicieron avanzar a preparación a gran escala y purificación expresando GFP a partir de un promotor de CMV o nLacZ a partir de un promotor de β -actina de pollo (CB). Los títulos del vector se determinaron por PCR en tiempo real TaqMan usando cebadores y sonda específicos de poliA de hormona del crecimiento bovino (bGH).

20 *B. Transducción de cultivos de células epiteliales de las vías respiratorias humanas*

Los perfiles de transducción de estos seis vectores se examinaron entonces en cultivos celulares de epitelio de las vías respiratorias humanas (HAE) para determinar su capacidad de transducir vías respiratorias de conducción humanas [TE Gray, et al., Am J Respir Cell Mol Biol, 14: 104-12 (1996)]. Se sembraron células HAE primarias (Lonza) a ~50 000 células/pocillo en placas Transwell de 24 pocillos. Una vez que estuvieron completamente confluentes, estas células se cultivaron en la superficie de contacto de aire-líquido durante al menos 4 semanas antes de usarse en experimentos para permitir la apropiada diferenciación celular. Para examinar la transducción de AAV de células HAE, se añadieron las seis quimeras de AAV, más AAV2/6 y AAV2/9 como controles, que expresaban GFP a la superficie apical de las células HAE a 1×10^{11} copias de genoma (GC)/pocillo en 50 μ l. El vector se retiró 2 horas después y las células se mantuvieron en la superficie de contacto de aire-líquido. La expresión de GFP se evaluó cinco días después.

Este experimento reveló que el intercambio de las regiones IV-V de bucle variable en la cápside de AAV6 (aminoácidos 447-521 de la SEQ ID NO: 1) en la cápside de AAV9 (AAV2/9-6VL IV-V) confería transducción similar a la de AAV6, mientras que AAV9 no transducía de forma normal las vías respiratorias de conducción. A la inversa, el intercambio de la región homóloga de AAV9 en la cápside de AAV6 (AAV2/6-9VL IV-V) anuló la capacidad de AAV6 de transducir células HAE de forma eficaz. Esto indica que este dominio de la cápside de AAV6 es importante para el tropismo de las vías respiratorias de conducción. Adicionalmente, este fenómeno es específico para las regiones IV-V de bucle variable de AAV6 porque no se observaron los mismos resultados para las otras quimeras.

C. Transducción in vivo de pulmón murino

También se examinaron los perfiles de transducción de estos vectores en el pulmón de ratón después de instilación intranasal. Se suministraron 1×10^{11} GC de cada quimera que expresaba nLacZ, más AAV2/6 y AAV2/9 como controles, por vía intranasal a ratones C57Bl/6 en 50 μ l de volumen total de solución salina tamponada con fosfato (PBS). Veintiún días después, los pulmones se inflaron con una mezcla 1:1 de compuesto de temperatura de corte óptimo (OCT) y PBS, se retiraron y congelaron en OCT para el seccionamiento y tinción para expresión de β -gal.

De nuevo, se observó que el intercambio de las regiones IV-V de bucle variable de la cápside de AAV6 en la cápside de AAV9 confería un tropismo novedoso en AAV9 por el epitelio de las vías respiratorias de conducción. Y a la inversa, el intercambio de la región homóloga de AAV9 en la cápside de AAV6 anuló la transducción de AAV6.

Tomados en conjunto, estos estudios indican que se ha identificado un dominio de la cápside de AAV6 importante para la transducción de las vías respiratorias de conducción. Las regiones IV-V de bucle variable (aminoácidos 447-521 de AAV6) están ubicadas en protuberancias expuestas en superficie del eje triple icosaédrico de la cápside y pueden determinar interacciones celulares necesarias para la transducción.

60 Ejemplo 2: Quimera de AAV6/9 que tiene IV de VL estrecho y V de VL estrecho de AAV6 en la cápside de AAV9 A. Construcción de quimera de con las regiones IV - V de bucle variable

Se insertaron fragmentos estrechos del bucle IV variable de AAV6 y el bucle V variable en la cápside de AAV9 de la que se retiraron las regiones correspondientes de AAV9 usando corte y empalme con PCR por prolongación solapante, usando los métodos descritos en el ejemplo 1. F se refiere al cebador directo y R al cebador inverso.

65 VP1 - IV de VL estrecho de AAV9

5'- AGACGCGGAAGCTTCGATCAACTAC -3' F SEQ ID NO: 11
5'- TCCGGACTGATTCTG/AGTCTTTGAGAGAT -3' R SEQ ID NO: 12

IV de VL estrecho de AAV6

5'- ATCTCTCAAAGACT/CAGAATCAGTCCGGA -3' F SEQ ID NO: 13
5'- ACAGCCATGTT/AGCTGGAGACCC -3' R SEQ ID NO: 14

IV de VL estrecho - V de VL estrecho de AAV9

5'- GGGTCTCCAGCT/AACATGGCTGT -3' F SEQ ID NO: 15
5'- TAGAAACGCGCTGTTGTCTGGTAGCTGG -3' R SEQ ID NO: 16

V de VL estrecho de AAV6

5'- GCTACCGACAACAGCGCGTTTCT -3' F SEQ ID NO: 17
5'- CCAAGAAGAAGC/ACCAGTCCAGGTA -3' R SEQ ID NO: 18

V de VL estrecho de AAV9 - fin

5'-TACCTGGACTGGT/GCTTCTTCTTGG -3' F SEQ ID NO: 19
5'-ACCTCTAGTCCTGCAGGTTTAAACG -3' R SEQ ID NO: 20

El IV de VL estrecho de AAV6 corresponde a las secuencias de aminoácidos 450-469 de la SEQ ID NO: 1. El V de VL estrecho de AAV6 corresponde a las secuencias de aminoácidos 487-505 de la SEQ ID NO: 1. La cápside quimérica resultante contiene secuencias de la cápside de AAV9 flanqueando tanto el extremo amino como el extremo carboxi de cada una de las regiones de bucle variable de AAV6, incluyendo las secuencias de aminoácidos ubicadas entre el extremo carboxi del IV de VL estrecho de AAV6 y el extremo amino del V de VL estrecho de AAV6.

Las secuencias de cápside quimérica construida se clonaron en un plásmido que contenía el gen *rep* de AAV2 por digestión del sitio de restricción y después se transfectaron en células 293 en placas de seis pocillos, junto con un plásmido que contenía luciferasa de luciérnaga (*ffluc*) expresada a partir de un promotor de citomegalovirus (CMV) y flanqueada por las repeticiones terminales invertidas de (ITR) de AAV2 más un plásmido auxiliar AdV. El medio se cambió un día después de la transfección y el lisado celular se recogió tres días después de la transfección. Los lisados se congelaron/descongelaron tres veces y se centrifugaron para eliminar los desechos celulares. Entonces se titularon las copias de genoma del vector (GC) por PCR cuantitativa usando cebadores y sonda específicos de polIA de SV40.

La partícula vírica de AAV quimérica resultante que porta el casete de expresión de *ffluc* mostró títulos a un nivel de aproximadamente 1×10^{11} copias de genoma/ml, que es intermedio entre los títulos observados para los controles de AAV2/6 y AAV2/9 que contenían los mismos casetes de expresión, pero cápsides de AAV6 o AAV9 intactas, respectivamente.

Para examinar la transducción *in vitro*, se sembraron células 293 a 1×10^5 células/pocillo en placas de 96 pocillos. Se añadió 1×10^9 GC de cada vector a las células por triplicado en 100 μ l de volumen total de medio. Después de incubación durante una noche, el vector se retiró y reemplazó con medio reciente. A las 72 horas después de la transducción, se examinó la expresión de *ffluc* por imágenes de luminiscencia.

Una construcción quimérica preparada como se describe anteriormente, AAV2/9 que tiene una región de bucle IV variable estrecho y una región de bucle V variable estrecho (aminoácidos 487-505 de AAV 6) se ensayó a un título de pequeña escala y para transducción *in vitro* en células 293. Se observaron títulos de aproximadamente 1×10^{11} copias de genoma/ml; estos títulos son mayores que los observados para el control de AAV2/6, pero inferiores al observado de control de AAV2/9. Los niveles de transducción *In vitro* para el AAV2/9 quimérico que tiene una región de bucle IV variable de AAV6 y una región de bucle V variable estrecho fueron inferiores a los observados para AAV2/6, pero mayores que los de AAV2/9.

Los resultados mostraron que niveles de transducción para el AAV6 quimérico con el IV estrecho y V estrecho eran ligeramente mayores que AAV2/9, e inferiores que AAV2/6.

Se están preparando preparaciones a gran escala para estas construcciones y se evaluarán en pulmón murino como se describe en el ejemplo 1.

Ejemplo 3: AAV6/9 quimérico que tiene el bucle V variable de AAV6 en la cápside de AAV9

Fragmentos estrechos del bucle V variable de AAV6 se insertaron en la cápside de AAV9 (en ausencia del bucle IV de AAV6) de la que se retira la región correspondiente de AAV9 usando corte y empalme de PCR por prolongación solapante, usando los métodos descritos en el ejemplo 1. F se refiere al cebador directo y R al cebador inverso.

Una de las construcciones de cápside quimérica contiene únicamente un fragmento estrecho del bucle V variable de AAV6 en la cápside de AAV9: aminoácidos 1 - 486 de AAV9, aminoácidos 487-505 de AAV 6 (SEQ ID NO: 1) y aminoácidos 487-736 de AAV9. Se utilizan los siguientes cebadores para esta construcción.

quimera de V de VL estrecho de AAV6 solamente:

VP1 - V de VL estrecho de AAV9

10	5'-AGACGCGGAAGCTTCGATCAACTAC -3'	F	SEQ ID NO: 27
	5'- TAGAAACGCGCTGTTGTCGGTAGCTGG -3'	R	SEQ ID NO: 28

Otra construcción de cápside quimérica contiene ambos fragmentos estrechos del bucle V variable y bucle IV variable de AAV6 insertado en las regiones correspondientes de la cápside de AAV9.

V de VL estrecho de AAV6 (que amplifica la región que codifica los aminoácidos 487-505 de la SEQ ID NO: 1)

5'- GCTACCGACAACAGCGCGTTTCT -3'	F	SEQ ID NO: 29
5'- CCAAGAAGAAGC/ACCAGTCCAGGTA -3'	R	SEQ ID NO: 30

V de VL estrecho de AAV9 - fin

5' - TACCTGGACTGGT/GCTTCTTCTTGG -3'	F	SEQ ID NO: 31
5'-ACCTCTAGTCCTGCAGGTTTAAACG -3'	R	SEQ ID NO: 32

Una construcción quimérica, AAV2/9 que tiene una región de bucle V variable estrecho (aminoácidos 487-505 de AAV 6) se ensayó a título de pequeña escala y para transducción *in vitro* en células 293. Tiene un título ligeramente inferior que AAV2/6 ($\sim 3 \times 10^{10}$), pero transducción *in vitro* similar a AAV2/6.

Ejemplo 4: AAV6/9 quimérico que tiene el fragmento IV de VL de AAV6 en cápside de AAV9

Se insertan fragmentos estrechos modificados del bucle IV variable de AAV6 en la cápside de AAV9 de la que se retira la región correspondiente de AAV9 usando corte y empalme de PCR por prolongación solapante, usando los métodos descritos en el ejemplo 1. Se utilizan los siguientes cebadores. F se refiere al cebador directo y R al cebador inverso. VP1- IV de VL amplio de AAV9

5'-AGACGCGGAAGCTTCGATCAACTAC -3'	F	SEQ ID NO: 33
5'- GGATTCATYAGYCGGTCCAGGCT -3'	R	SEQ ID NO: 34

IV de VL amplio L y estrecho R de AAV6 (que amplifica la región que codifica los aminoácidos 447 - 469 de AAV6)

5'-AGCCTGGACCGRCTRATGAATCC -3'	F	SEQ ID NO: 35
5'-ACAGCCATGTT/AGCTGGAGACCC -3'	R	SEQ ID NO: 36

IV de VL estrecho de AAV9 - fin

5'- GGGTCTCCAGCT/AACATGGCTGT -3'	F	SEQ ID NO: 37
5'-ACCTCTAGTCCTGCAGGTTTAAACG -3'	R	SEQ ID NO: 38

Se observaron malos resultados de transducción para construcciones quiméricas que contenían únicamente el bucle IV variable de AAV6, o un fragmento estrecho del mismo, en ausencia de bucle V variable de AAV6. Sin embargo, se ha preparado otra construcción que contenía aminoácidos adicionales en el extremo amino de la región VL IV. Esta construcción contiene los aminoácidos 447 a 469 de AAV6.

Aunque la invención se ha descrito con referencia a una realización particularmente preferida, se apreciará que pueden hacerse modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Lista de secuencias

<110> Los administradores de la Universidad de Pensilvania

<120> Composiciones para dirigir células de las vías respiratorias de conducción que comprenden construcciones de virus adenoasociado

<130> RTM/12140

<150> US 61/174.149

<151> 30/04/2009

<150> PCT/US10/32943

<151> 29/04/2010

5 <150> EP 10716723.1

<151> 29/04/2010

<160> 38

10 <170> PatentIn versión 3.5

 $\langle 210 \rangle$ 1

<211> 736

<212> PRT

15 <213> Desconocido

 $\langle 220 \rangle$

<223> cápside del virus adenoasociado 6

20 <400> 1

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
1 5 10 15

Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Asp Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro
20 25 30

Lys Ala Asn Gln Gln Lys Gln Asp Asp Gly Arg Gly Leu Val Leu Pro
35 40 45

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
50 55 60

Val	Asn	Ala	Ala	Asp	Ala	Ala	Ala	Leu	Glu	His	Asp	Lys	Ala	Tyr	Asp
65					70					75					80

Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Arg Tyr Asn His Ala
85 90 95

Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Gln Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
100 105 110

Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro
115 120 125

ES 2 724 122 T3

Phe Gly Leu Val Glu Glu Gly Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
 130 135 140
 Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ser Gly Ile Gly
 145 150 155 160
 Lys Thr Gly Gln Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
 165 170 175
 Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Glu Pro Pro
 180 185 190
 Ala Thr Pro Ala Ala Val Gly Pro Thr Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly
 195 200 205
 Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Asn Ala
 210 215 220
 Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile
 225 230 235 240
 Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu
 245 250 255
 Tyr Lys Gln Ile Ser Ser Ala Ser Thr Gly Ala Ser Asn Asp Asn His
 260 265 270
 Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg Phe
 275 280 285
 His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn Asn
 290 295 300
 Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile Gln
 305 310 315 320
 Val Lys Glu Val Thr Thr Asn Asp Gly Val Thr Thr Ile Ala Asn Asn
 325 330 335
 Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Ser Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro
 340 345 350
 Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro Ala
 355 360 365
 Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly
 370 375 380

ES 2 724 122 T3

Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe Pro
 385 390 395 400
 Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Thr Phe Ser Tyr Thr Phe
 405 410 415
 Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp
 420 425 430
 Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Asn Arg
 435 440 445
 Thr Gln Asn Gln Ser Gly Ser Ala Gln Asn Lys Asp Leu Leu Phe Ser
 450 455 460
 Arg Gly Ser Pro Ala Gly Met Ser Val Gln Pro Lys Asn Trp Leu Pro
 465 470 475 480
 Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys Thr Lys Thr Asp Asn
 485 490 495
 Asn Asn Ser Asn Phe Thr Trp Thr Gly Ala Ser Lys Tyr Asn Leu Asn
 500 505 510
 Gly Arg Glu Ser Ile Ile Asn Pro Gly Thr Ala Met Ala Ser His Lys
 515 520 525
 Asp Asp Lys Asp Lys Phe Phe Pro Met Ser Gly Val Met Ile Phe Gly
 530 535 540
 Lys Glu Ser Ala Gly Ala Ser Asn Thr Ala Leu Asp Asn Val Met Ile
 545 550 555 560
 Thr Asp Glu Glu Glu Ile Lys Ala Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Arg
 565 570 575
 Phe Gly Thr Val Ala Val Asn Leu Gln Ser Ser Ser Thr Asp Pro Ala
 580 585 590
 Thr Gly Asp Val His Val Met Gly Ala Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
 595 600 605
 Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His
 610 615 620
 Thr Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu

ES 2 724 122 T3

625		630		635		640									
Lys	His	Pro	Pro	Pro	Gln	Ile	Leu	Ile	Lys	Asn	Thr	Pro	Val	Pro	Ala
				645					650					655	
Asn	Pro	Pro	Ala	Glu	Phe	Ser	Ala	Thr	Lys	Phe	Ala	Ser	Phe	Ile	Thr
			660					665					670		
Gln	Tyr	Ser	Thr	Gly	Gln	Val	Ser	Val	Glu	Ile	Glu	Trp	Glu	Leu	Gln
		675					680					685			
Lys	Glu	Asn	Ser	Lys	Arg	Trp	Asn	Pro	Glu	Val	Gln	Tyr	Thr	Ser	Asn
	690					695					700				
Tyr	Ala	Lys	Ser	Ala	Asn	Val	Asp	Phe	Thr	Val	Asp	Asn	Asn	Gly	Leu
705					710					715					720
Tyr	Thr	Glu	Pro	Arg	Pro	Ile	Gly	Thr	Arg	Tyr	Leu	Thr	Arg	Pro	Leu
				725					730					735	

<210> 2

<211> 736

<212> PRT

<213> Desconocido

<220>

<223> cápside del virus adenoasociado 9

<400> 2

ES 2 724 122 T3

Met	Ala	Ala	Asp	Gly	Tyr	Leu	Pro	Asp	Trp	Leu	Glu	Asp	Asn	Leu	Ser	1	5	10	15
Glu	Gly	Ile	Arg	Glu	Trp	Trp	Ala	Leu	Lys	Pro	Gly	Ala	Pro	Gln	Pro	20	25	30	
Lys	Ala	Asn	Gln	Gln	His	Gln	Asp	Asn	Ala	Arg	Gly	Leu	Val	Leu	Pro	35	40	45	
Gly	Tyr	Lys	Tyr	Leu	Gly	Pro	Gly	Asn	Gly	Leu	Asp	Lys	Gly	Glu	Pro	50	55	60	
Val	Asn	Ala	Ala	Asp	Ala	Ala	Ala	Leu	Glu	His	Asp	Lys	Ala	Tyr	Asp	65	70	75	80
Gln	Gln	Leu	Lys	Ala	Gly	Asp	Asn	Pro	Tyr	Leu	Lys	Tyr	Asn	His	Ala	85	90	95	
Asp	Ala	Glu	Phe	Gln	Glu	Arg	Leu	Lys	Glu	Asp	Thr	Ser	Phe	Gly	Gly	100	105	110	

ES 2 724 122 T3

Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Leu Leu Glu Pro
 115 120 125
 Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
 130 135 140
 Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ala Gly Ile Gly
 145 150 155 160
 Lys Ser Gly Ala Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
 165 170 175
 Gly Asp Thr Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro Pro
 180 185 190
 Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Leu Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly
 195 200 205
 Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser
 210 215 220
 Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile
 225 230 235 240
 Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu
 245 250 255
 Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn
 260 265 270
 Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg
 275 280 285
 Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn
 290 295 300
 Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile
 305 310 315 320
 Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn
 325 330 335
 Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu
 340 345 350
 Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro

ES 2 724 122 T3

Ala	Asp	Val	Phe	Met	Ile	Pro	Gln	Tyr	Gly	Tyr	Leu	Thr	Leu	Asn	Asp	370	375	380	
Gly	Ser	Gln	Ala	Val	Gly	Arg	Ser	Ser	Phe	Tyr	Cys	Leu	Glu	Tyr	Phe	385	390	395	400
Pro	Ser	Gln	Met	Leu	Arg	Thr	Gly	Asn	Asn	Phe	Gln	Phe	Ser	Tyr	Glu	405	410	415	
Phe	Glu	Asn	Val	Pro	Phe	His	Ser	Ser	Tyr	Ala	His	Ser	Gln	Ser	Leu	420	425	430	
Asp	Arg	Leu	Met	Asn	Pro	Leu	Ile	Asp	Gln	Tyr	Leu	Tyr	Tyr	Leu	Ser	435	440	445	
Lys	Thr	Ile	Asn	Gly	Ser	Gly	Gln	Asn	Gln	Gln	Thr	Leu	Lys	Phe	Ser	450	455	460	
Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Asn	Met	Ala	Val	Gln	Gly	Arg	Asn	Tyr	Ile	Pro	465	470	475	480
Gly	Pro	Ser	Tyr	Arg	Gln	Gln	Arg	Val	Ser	Thr	Thr	Val	Thr	Gln	Asn	485	490	495	
Asn	Asn	Ser	Glu	Phe	Ala	Trp	Pro	Gly	Ala	Ser	Ser	Trp	Ala	Leu	Asn	500	505	510	
Gly	Arg	Asn	Ser	Leu	Met	Asn	Pro	Gly	Pro	Ala	Met	Ala	Ser	His	Lys	515	520	525	
Glu	Gly	Glu	Asp	Arg	Phe	Phe	Pro	Leu	Ser	Gly	Ser	Leu	Ile	Phe	Gly	530	535	540	
Lys	Gln	Gly	Thr	Gly	Arg	Asp	Asn	Val	Asp	Ala	Asp	Lys	Val	Met	Ile	545	550	555	560
Thr	Asn	Glu	Glu	Glu	Ile	Lys	Thr	Thr	Asn	Pro	Val	Ala	Thr	Glu	Ser	565	570	575	
Tyr	Gly	Gln	Val	Ala	Thr	Asn	His	Gln	Ser	Ala	Gln	Ala	Gln	Ala	Gln	580	585	590	
Thr	Gly	Trp	Val	Gln	Asn	Gln	Gly	Ile	Leu	Pro	Gly	Met	Val	Trp	Gln	595	600	605	

ES 2 724 122 T3

Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His
610 615 620

Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Met
625 630 635 640

Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala
645 650 655

Asp Pro Pro Thr Ala Phe Asn Lys Asp Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr
660 665 670

Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln
675 680 685

Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn
690 695 700

Tyr Tyr Lys Ser Asn Asn Val Glu Phe Ala Val Asn Thr Glu Gly Val
705 710 715 720

Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu
725 730 735

<210> 3

<211> 736

5 <212> PRT

<213> Desconocido

<220>

10 <223> cápside del virus adenoasociado 1

<400> 3

ES 2 724 122 T3

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
1 5 10 15

Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Asp Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro
20 25 30

Lys Ala Asn Gln Gln Lys Gln Asp Asp Gly Arg Gly Leu Val Leu Pro
35 40 45

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
50 55 60

Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65 70 75 80

Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Arg Tyr Asn His Ala

ES 2 724 122 T3

Asp	Ala	Glu	Phe	Gln	Glu	Arg	Leu	Gln	Glu	Asp	Thr	Ser	Phe	Gly	Gly		
			100					105						110			
Asn	Leu	Gly	Arg	Ala	Val	Phe	Gln	Ala	Lys	Lys	Arg	Val	Leu	Glu	Pro		
		115					120					125					
Leu	Gly	Leu	Val	Glu	Glu	Gly	Ala	Lys	Thr	Ala	Pro	Gly	Lys	Lys	Arg		
	130					135					140						
Pro	Val	Glu	Gln	Ser	Pro	Gln	Glu	Pro	Asp	Ser	Ser	Ser	Gly	Ile	Gly		
145					150					155					160		
Lys	Thr	Gly	Gln	Gln	Pro	Ala	Lys	Lys	Arg	Leu	Asn	Phe	Gly	Gln	Thr		
			165						170					175			
Gly	Asp	Ser	Glu	Ser	Val	Pro	Asp	Pro	Gln	Pro	Leu	Gly	Glu	Pro	Pro		
			180					185					190				
Ala	Thr	Pro	Ala	Ala	Val	Gly	Pro	Thr	Thr	Met	Ala	Ser	Gly	Gly	Gly		
		195					200					205					
Ala	Pro	Met	Ala	Asp	Asn	Asn	Glu	Gly	Ala	Asp	Gly	Val	Gly	Asn	Ala		
	210					215					220						
Ser	Gly	Asn	Trp	His	Cys	Asp	Ser	Thr	Trp	Leu	Gly	Asp	Arg	Val	Ile		
225					230					235					240		
Thr	Thr	Ser	Thr	Arg	Thr	Trp	Ala	Leu	Pro	Thr	Tyr	Asn	Asn	His	Leu		
				245					250					255			
Tyr	Lys	Gln	Ile	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Gly	Ala	Ser	Asn	Asp	Asn	His		
		260						265					270				
Tyr	Phe	Gly	Tyr	Ser	Thr	Pro	Trp	Gly	Tyr	Phe	Asp	Phe	Asn	Arg	Phe		
		275					280					285					
His	Cys	His	Phe	Ser	Pro	Arg	Asp	Trp	Gln	Arg	Leu	Ile	Asn	Asn	Asn		
	290					295					300						
Trp	Gly	Phe	Arg	Pro	Lys	Arg	Leu	Asn	Phe	Lys	Leu	Phe	Asn	Ile	Gln		
305					310					315					320		
Val	Lys	Glu	Val	Thr	Thr	Asn	Asp	Gly	Val	Thr	Thr	Ile	Ala	Asn	Asn		
				325					330					335			

ES 2 724 122 T3

Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Ser Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro
 340 345 350
 Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro Ala
 355 360 365
 Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly
 370 375 380
 Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe Pro
 385 390 395 400
 Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Thr Phe Ser Tyr Thr Phe
 405 410 415
 Glu Glu Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp
 420 425 430
 Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Asn Arg
 435 440 445
 Thr Gln Asn Gln Ser Gly Ser Ala Gln Asn Lys Asp Leu Leu Phe Ser
 450 455 460
 Arg Gly Ser Pro Ala Gly Met Ser Val Gln Pro Lys Asn Trp Leu Pro
 465 470 475 480
 Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys Thr Lys Thr Asp Asn
 485 490 495
 Asn Asn Ser Asn Phe Thr Trp Thr Gly Ala Ser Lys Tyr Asn Leu Asn
 500 505 510
 Gly Arg Glu Ser Ile Ile Asn Pro Gly Thr Ala Met Ala Ser His Lys
 515 520 525
 Asp Asp Glu Asp Lys Phe Phe Pro Met Ser Gly Val Met Ile Phe Gly
 530 535 540
 Lys Glu Ser Ala Gly Ala Ser Asn Thr Ala Leu Asp Asn Val Met Ile
 545 550 555 560
 Thr Asp Glu Glu Glu Ile Lys Ala Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Arg
 565 570 575
 Phe Gly Thr Val Ala Val Asn Phe Gln Ser Ser Ser Thr Asp Pro Ala
 580 585 590

ES 2 724 122 T3

Thr Gly Asp Val His Ala Met Gly Ala Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
595 600 605

Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His
610 615 620

Thr Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu
625 630 635 640

Lys Asn Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala
645 650 655

Asn Pro Pro Ala Glu Phe Ser Ala Thr Lys Phe Ala Ser Phe Ile Thr
660 665 670

Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln
675 680 685

Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Val Gln Tyr Thr Ser Asn
690 695 700

Tyr Ala Lys Ser Ala Asn Val Asp Phe Thr Val Asp Asn Asn Gly Leu
705 710 715 720

Tyr Thr Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Pro Leu
725 730 735

<210> 4

<211> 75

<212> PRT

<213> Desconocido

<220>

<223> fragmento de cápside de AAV de clado A

<400> 4

Asn Arg Thr Gln Asn Gln Ser Gly Ser Ala Gln Asn Lys Asp Leu Leu
1 5 10 15

Phe Ser Arg Gly Ser Pro Ala Gly Met Ser Val Gln Pro Lys Asn Trp
20 25 30

Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys Thr Lys Thr
35 40 45

Asp Asn Asn Asn Ser Asn Phe Thr Trp Thr Gly Ala Ser Lys Tyr Asn
50 55 60

ES 2 724 122 T3

	Leu	Asn	Gly	Arg	Glu	Ser	Ile	Ile	Asn	Pro	Gly
	65					70					75
5	<210> 5 <211> 23 <212> ADN <213> Desconocido										
10	<220> <223> cebador basado en virus adenoasociado 6 <400> 5 agcctggacc grctratgaa tcc 23										
15	<210> 6 <211> 23 <212> ADN <213> Desconocido										
20	<220> <223> cebador basado en virus adenoasociado 6 <400> 6 gccatagcag gtccaggggtt gat 23										
25	<210> 7 <211> 25 <212> ADN <213> Desconocido										
30	<220> <223> cebador basado en virus adenoasociado 9 <400> 7 agacgcggaa gcttcgatca actac 25										
35	<210> 8 <211> 23 <212> ADN <213> Desconocido										
40	<220> <223> cebador basado en virus adenoasociado 9 <400> 8 ggattcatya gycgtccag gct 23										
45	<210> 9 <211> 23 <212> ADN <213> Desconocido										
50	<220> <223> cebador basado en virus adenoasociado 9 <400> 9 atcaaccctg gacctgctat ggc 23										
55	<210> 10 <211> 25 <212> ADN <213> Desconocido										
60											

<220>
 <223> cebador basado en virus adenoasociado 9

 <400> 10
 5 acctctagtc ctgcagggtt aaacg 25

 <210> 11
 <211> 25
 <212> ADN
 10 <213> Desconocido

 <220>
 <223> cebador basado en virus adenoasociado 9

 <400> 11
 15 agacgcggaa gcttcgatca actac 25

 <210> 12
 <211> 29
 20 <212> ADN
 <213> Desconocido

 <220>
 <223> cebador basado en virus adenoasociado 9
 25
 <400> 12
 tccggactga ttctgagtct ttgagagat 29

 <210> 13
 30 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Desconocido

 <220>
 35 <223> cebador basado en virus adenoasociado 6

 <400> 13
 atctctcaaa gactcagaat cagtccgga 29
 40
 <210> 14
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Desconocido

 45 <220>
 <223> cebador basado en virus adenoasociado 6

 <400> 14
 50 acagccatgt tagctggaga ccc 23

 <210> 15
 <211> 23
 <212> ADN
 55 <213> Desconocido

 <220>
 <223> cebador basado en virus adenoasociado 9

 <400> 15
 60 ggggtctccag ctaacatggc tgt 23

 <210> 16
 <211> 27
 <212> ADN
 65 <213> Desconocido

<220>
 <223> cebador basado en virus adenoasociado 9
 5 <400> 16
 tagaaacgcg ctgtgtcgg tagctgg 27
 <210> 17
 <211> 23
 10 <212> ADN
 <213> Desconocido
 <220>
 <223> cebador basado en virus adenoasociado 6
 15 <400> 17
 gctaccgaca acagcgcgtt tct 23
 <210> 18
 20 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Desconocido
 <220>
 25 <223> cebador basado en virus adenoasociado 6
 <400> 18
 ccaagaagaa gcaccagtc aggta 25
 30 <210> 19
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Desconocido
 35 <220>
 <223> cebador basado en virus adenoasociado 9
 <400> 19
 40 tacctggact ggtgcttctt ctgg 25
 <210> 20
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Desconocido
 45 <220>
 <223> cebador basado en virus adenoasociado 9
 <400> 20
 50 acctctagtc ctgcagggtt aaacg 25
 <210> 21
 <211> 25
 <212> ADN
 55 <213> Desconocido
 <220>
 <223> cebador basado en virus adenoasociado 9
 60 <400> 21
 agacgcggaa gcttcgatca actac 25
 <210> 22
 <211> 29

<212> ADN
 <213> Desconocido

 5 <220>
 <223> cebador basado en virus adenoasociado 9

 <400> 22
 tccggactga ttctgagtct ttgagagat 29

 10 <210> 23
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Desconocido

 15 <220>
 <223> cebador basado en virus adenoasociado 6

 <400> 23
 atctctcaaa gactcagaat cagtccgga 29
 20
 <210> 24
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Desconocido
 25
 <220>
 <223> cebador basado en virus adenoasociado 6

 <400> 24
 30 acagccatgt tagctggaga ccc 23

 <210> 25
 <211> 23
 <212> ADN
 35 <213> Desconocido

 <220>
 <223> cebador basado en virus adenoasociado 9
 40 <400> 25
 ggggtctccag ctaacatggc tgt 23

 <210> 26
 <211> 25
 45 <212> ADN
 <213> Desconocido

 <220>
 <223> cebador basado en virus adenoasociado 9
 50 <400> 26
 acctctagtc ctgcagggtt aaacg 25

 <210> 27
 55 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Desconocido

 <220>
 60 <223> cebador basado en virus adenoasociado 9

 <400> 27
 agacgcggaa gcttcgatca actac 25

5
 <210> 28
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Desconocido
 <220>
 <223> cebador basado en virus adenoasociado 9

10
 <400> 28
 tagaaacgcg ctgtgtcgg tagctg 26

15
 <210> 29
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Desconocido
 <220>
 <223> cebador basado en virus adenoasociado 6

20
 <400> 29
 gctaccgaca acagcgcgtt tct 23

25
 <210> 30
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Desconocido
 <220>
 <223> cebador basado en virus adenoasociado 6

30
 <400> 30
 ccaagaagaa gcaccagtcc aggta 25

35
 <210> 31
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Desconocido
 <220>
 <223> cebador basado en virus adenoasociado 9

40
 <400> 31
 tacctggact ggtgcttctt ctgg 25

45
 <210> 32
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Desconocido
 <220>
 <223> cebador basado en virus adenoasociado 9

50
 <400> 32
 acctctagtc ctgcagggtt aaacg 25

55
 <210> 33
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Desconocido
 <220>
 <223> cebador basado en virus adenoasociado 9

60
 <400> 33

agacgcggaa gcttcgatca actac 25

5 <210> 34
<211> 23
<212> ADN
<213> Desconocido

10 <220>
<223> cebador basado en virus adenoasociado 9

<400> 34
ggattcatya gycggtccag gct 23

15 <210> 35
<211> 23
<212> ADN
<213> Desconocido

20 <220>
<223> cebador basado en virus adenoasociado 6

<400> 35
agcctggacc grctratgaa tcc 23

25 <210> 36
<211> 23
<212> ADN
<213> Desconocido

30 <220>
<223> cebador basado en virus adenoasociado 6

<400> 36
acagccatgt tagctggaga ccc 23

35 <210> 37
<211> 23
<212> ADN
<213> Desconocido

40 <220>
<223> cebador basado en virus adenoasociado 9

<400> 37
gggtctccag ctaacatggc tgt 23

45 <210> 38
<211> 25
<212> ADN
<213> Desconocido

50 <220>
<223> cebador basado en virus adenoasociado 9

55 <400> 38
acctctagtc ctgcaggttt aaacg 25

REIVINDICACIONES

1. Una cápside de AAV artificial que comprende un péptido dirigido a células de conducción de las vías respiratorias del fragmento de aminoácidos que abarca la región IV del bucle variable y la región V del bucle variable de una cápside de AAV de clado A, teniendo dicho péptido la secuencia del aminoácido 447 a 521 de la SEQ ID NO: 1, flanqueada por secuencias de cápside de AAV precursor que es de un clado diferente al clado A, en la que el péptido dirigido a células de conducción de las vías respiratorias es heterólogo a la cápside de AAV precursora, en la que la ubicación de la regiones de bucle variable es como se representa en la figura 2, en la que el péptido dirigido a células de conducción de las vías respiratorias está ubicado en la ubicación nativa de regiones de bucle variable correspondientes de la secuencia de cápside, cuyas regiones de bucle variable correspondientes se han eliminado.
2. La cápside de AAV artificial de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la cápside de AAV artificial comprende además un espaciador que flanquea el extremo carboxi y/o amino de las secuencias de aminoácidos de dicho péptido dirigido a células de conducción de las vías respiratorias, comprendiendo dicho espaciador de uno a cinco aminoácidos.
3. La cápside de AAV artificial de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el péptido dirigido a células de conducción de las vías respiratorias comprende además:
 - (a) de uno a cinco aminoácidos en el extremo amino del bucle IV variable de los AAV funcionales de clado A, pero exclusivos de la región III de bucle variable; y/o
 - (b) de uno a cinco aminoácidos en el extremo carboxi del péptido de los AAV funcionales de clado A, pero exclusivos de cualquier aminoácido de la región IV del bucle variable.
4. La cápside de AAV artificial de acuerdo con la reivindicación 1, en la que las secuencias de cápside de AAV que flanquean el péptido dirigido a células de conducción de las vías respiratorias se proporciona mediante un único AAV precursor seleccionado entre el grupo que consiste en AAV9, AAV5, AAV2, AAV8 y AAVrh32.33.
5. La cápside de AAV artificial de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la cápside de AAV artificial no tiene secuencias génicas de AAV funcionales empaquetadas en la misma.
6. La cápside de AAV artificial de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el péptido dirigido a células de conducción de las vías respiratorias tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4:

NRTQNQSGSAQNKDLLFSRGSPAGMSVQPKNW-

LPGPCYRQQRVSKTKTDNNSNFTWTGASKYNLNGRESIINPG.

7. Un vector de AAV que comprende una cápside de AAV artificial de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y un casete de expresión empaquetado en la cápside, en el que dicho casete de expresión comprende al menos una secuencia de repetición terminal invertida de AAV y un gen heterólogo unido de forma funcional a secuencias reguladoras que permiten la expresión del gen heterólogo en células de las vías respiratorias de conducción.
8. El vector de AAV de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el gen heterólogo codifica un producto génico útil para tratar o mejorar los síntomas de fibrosis quística.
9. El vector de AAV de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el gen heterólogo codifica un producto seleccionado del grupo que consiste en una secuencia del regulador transmembranario de fibrosis quística (CFTR) funcional, alfa-1-antitripsina (A1AT), proteína C tensioactiva (SPC) y proteína D tensioactiva (SPD).
10. Una composición farmacéutica que comprende el vector de AAV de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 y un vehículo fisiológicamente compatible.
11. Un método de alteración de la especificidad de un vector de AAV seleccionado de modo que se dirija a células de las vías respiratorias de conducción, comprendiendo dicho método la etapa de proporcionar el AAV con un péptido dirigido a células de conducción de las vías respiratorias de la región IV y V del bucle variable de una cápside de AAV de clado A, teniendo dicho péptido la secuencia del aminoácido 447 a 521 de la SEQ ID NO: 1, en el que el péptido dirigido a células de conducción de las vías respiratorias es heterólogo a la cápside de AAV precursora, en el que la región de cápside de AAV nativa que comprende una región IV y V de bucle variable del AAV seleccionado está anulada.

FIG. 1A

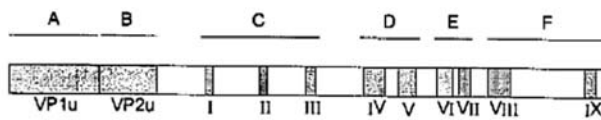


FIG 1B

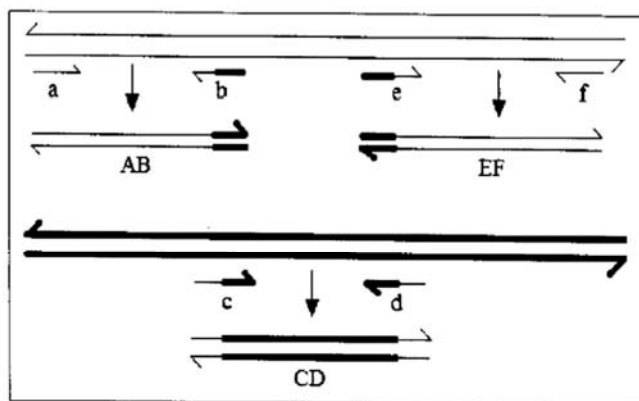
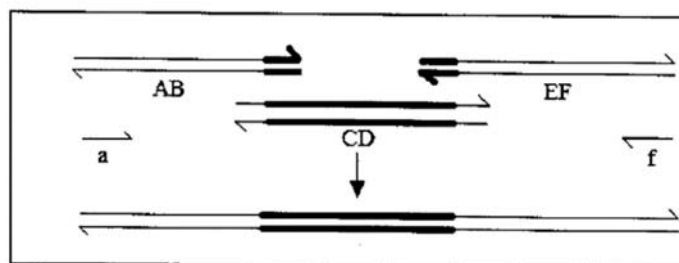


FIG 1C



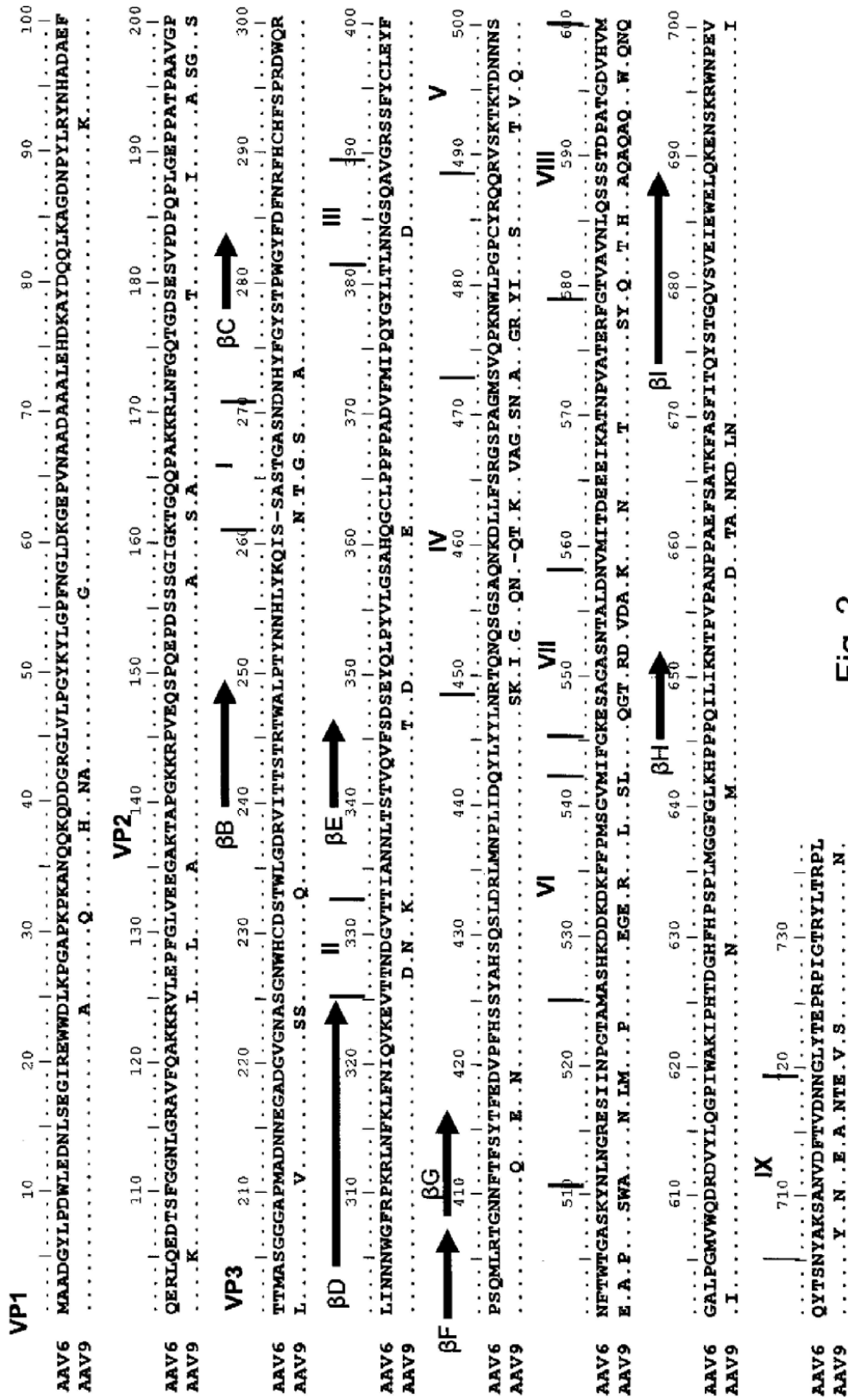


Fig. 2