

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 724 800**

51 Int. Cl.:

C12N 15/861 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.02.2012 PCT/US2012/025550**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.08.2012 WO12112832**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.02.2012 E 12705773 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2019 EP 2675902**

54 Título: **Composiciones y métodos para alterar la especificidad de tejido y mejorar la transferencia génica mediada por AAV9**

30 Prioridad:

17.02.2011 US 201161443879 P

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

16.09.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**WILSON, JAMES M.;
BELL, CHRISTIE L. y
VANDENBERGHE, LUC H.**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 724 800 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 y métodos para alterar la especificidad de tejido y mejorar la transferencia génica mediada por AAV9

5 Declaración con Respecto a la Investigación o Desarrollo con Fondos Federales

La presente invención se realizó con soporte del gobierno con N.º P01-HL-059407, otorgado por el National Institutes of Health. El Gobierno tiene ciertos derechos sobre la presente invención.

10 Antecedentes de la invención

Los primeros vectores virales adenoasociados (AAV) evaluados para la terapia génica se basaron en el serotipo 2 (AAV2) y se demostró que transducen una variedad de células somáticas después del suministro *in vivo* [Z. Wu, et al (2006) Mol Ther, 14:316-327]. Uno de los primeros éxitos clínicos de la terapia génica utilizó un vector AAV2 para restaurar algunos aspectos de la visión después de la inyección subretiniana en pacientes con una forma hereditaria de ceguera [A. Kern, et al, (2003) J Virol, 77: 11072-11081; AM Maguire, et al, (2008) N Engl J Med, 358: 2240-2248]. La aplicación de vectores AAV2 para el tratamiento de otras enfermedades, sin embargo, no ha sido tan exitosa debido a eficacias de transducción deficientes y diversos problemas inmunológicos, tales como los anticuerpos neutralizantes preexistentes y la activación de linfocitos T contra la cápside [Wu, et al, citado anteriormente]. Se sabe que AAV2 utiliza proteoglicanos de heparán sulfato (HS) como receptor primario para el reconocimiento celular [Kern et al, citado anteriormente]. Se desarrollaron vectores adicionales basados en cápsides de AAV de otros serotipos existentes, tales como AAV1 y su relativo cercano AAV6, ambos de los cuales mostraron una transducción potenciada de la unión muscular y celular mediada por glicoproteínas sialiladas [Z. Wu et al, (2006) J Virol, 80:9093-9103; W. Xiao, et al, (1999) J Virol, 73: 3994-4003]. Los vectores basados en AAV5 también requieren la unión al ácido siálico (SA) unido a N, mientras que muestran una transducción potenciada en el SNC después de la inyección directa en el cerebro [RW Walters et al., (2001) J Biol Chem, 276: 20610-20616; BL Davidson, et al, (2000) Proc Natl Acad Sci USA, 97:3428-3432].

El documento WO 2010/127097 A1 (Univ. Pennsylvania, 4.11.2010) divulgó vectores virales de AAV que comprenden cápsides quiméricas derivadas de un clado F, es decir, AAV9 que comprende aminoácidos derivados de un AAV6 de clado A. Los experimentos de transducción se llevaron a cabo *in vitro* así como *in vivo* y revelaron que el intercambio de las regiones de bucle variable IV-V de la cápside de AAV6 en la cápside de AAV9 confería una transducción similar a la de AAV6, mientras que AAV9 no transduce normalmente la vía respiratoria conductora.

Tanto el AAV4 como el AAV5 requieren unión al ácido siálico para la hemaglutinación y la transducción eficaz, pero difieren en la especificidad del enlace con el ácido siálico [Kaludov et al., (2001) J Virol, 75:6884-6893]. En el virus de la gripe A, el ácido siálico se elimina de los glucoconjugados de la superficie celular por la actividad enzimática sialidasa de la neuraminidasa de la superficie vírica, lo que facilita la gemación de viriones de la progenie de la superficie de la célula hospedadora [Suzuki et al., (2005) J Virol, 79:11705-11715].

El potencial de los vectores de AAV para la terapia génica humana se amplió a través del descubrimiento de una familia grande y diversa de nuevas cápsides de genomas latentes en tejidos de primates humanos y no humanos. Esta familia ampliada de AAV tiene más de 120 genomas que abarcan 6 clados antigénicos [G. Gao et al, (2003) Proc Natl Acad Sci USA, 100:6081-6086; G. Gao, et al, (2004) J Virol, 78: 6381-6388; G Gao et al, (2002) Proc Natl. Acad Sci USA, 99: 11854-11859]. Se han determinado las estructuras cristalinas de rayos X de alta resolución y las imágenes reconstruidas con microscopía crioelectrónica de baja resolución para muchas de las cápsides de AAV que muestran una región central altamente conservada con un total de 9 regiones hipervariables expuestas en la superficie [HJ Nam et al., (2007) J Virol, 81:12260-12271]. La evaluación de vectores basada en estas nuevas cápsides endógenas ha sido bastante prometedora en términos de lograr eficacias de transducción sustancialmente más altas con una disminución de las secuelas inmunitarias [G. Gao et al., (2002) Proc Natl Acad. Sci, citado anteriormente].

Han surgido vectores basados en virus adenoasociados (AAV) de serotipo 9 como candidatos principales para el suministro de genes *in vivo* a muchos órganos. El AAV9 ha mostrado una expectativa significativa al dirigirse al corazón para el tratamiento de cardiomiopatías [LT Bish, et al, (2008) Hum Gene Ther 19: 1359-1368] y a neuronas para tratar enfermedades tales como la atrofia muscular espinal [S. Duque, et al, (2009) Mol Ther, 17: 1187-1196; KD Foust et al, (2009) Nat Biotechnol, 27: 59-65]. AAV9 también transduce muy eficazmente las células epiteliales alveolares del pulmón sin provocar una respuesta humoral permitiendo una nueva administración eficaz del vector [MP Limberis y JM Wilson, (2006) Proc Natl. Acad Sci. USA, 103: 12993-12998]. Sin embargo, aún no se han definido los receptores que median estos tropismos.

Lo que se necesita son métodos seguros y eficaces para el suministro mediado por AAV de transgenes dentro de un hospedador. Sumario de la invención

La presente invención implica un enfoque farmacológico para modificar la disponibilidad del receptor para el AAV9 en una célula diana deseada y para modificar la eficacia del vector. Este enfoque fue posible debido al descubrimiento

de los inventores de que la β -galactosa terminal es el receptor primario para AAV9. Además, se anticipa que el enfoque será aplicable a otros AAV que contengan el dominio de unión a β -galactosa de AAV9.

5 En un aspecto, la invención proporciona una composición que comprende un vector viral de virus adenoasociado (AAV) que tiene una cápside de AAV de clado F que comprende un dominio de unión a β -galactosa de la superficie celular para su uso en terapia en combinación con una neuraminidasa que proporciona medios para la escisión enzimática de ácido siálico en un sujeto que tiene células con un glicano de superficie celular que tiene ácido siálico terminal y una penúltima β -galactosa, en donde dicho vector de AAV comprende además un minigén que tiene repeticiones terminales invertidas de AAV y un gen heterólogo unido operativamente a secuencias reguladoras que dirigen su expresión en una célula hospedadora.

10 La neuraminidasa escinde el ácido siálico terminal en el glicano y aumenta la eficacia de la captación de AAV por la célula al aumentar la disponibilidad de la β -galactosa. El sujeto puede tratarse previamente con la neuraminidasa. En un aspecto, la neuraminidasa es una exoneuraminidasa (es decir, se dirige a los ácidos siálicos terminales para la escisión al contrario que a los ácidos siálicos internos).

15 En otro ejemplo, los vectores AAV9 se redirigen lejos de un primer subconjunto de células que tienen β -galactosa terminal mediante la eliminación funcional de un resto de β -galactosa terminal de superficie celular expuesta en el primer subconjunto de células que tienen receptores para AAV9 (por ejemplo, glicanos de superficie celular que tienen restos de β -galactosa) y el AAV se redirige, a continuación, a un segundo subconjunto de células en el sujeto que tiene β -galactosa terminal y/o el número de AAV que entran en contacto con el segundo subconjunto de células aumenta, aumentado, de este modo, la captación por estas células. En un ejemplo, el resto que elimina funcionalmente el primer subconjunto de células se suministra localmente al primer subconjunto de células. En un ejemplo, una β -galactosa se suprime enzimáticamente en un primer subconjunto de células que tienen los receptores de superficie celular de AAV9, reduciendo o eliminando, de este modo, la captación de AAV por dicho subconjunto de células y redirigiendo el AAV a un segundo subconjunto de células en el sujeto que tienen receptores de AAV9 (β -galactosa terminal). En un ejemplo, la β -galactosa se elimina enzimáticamente suministrando galactosidasa al primer subconjunto de células en combinación con los vectores AAV9. En otro ejemplo, se suministra al sujeto una lectina que se une a los restos de β -galactosa terminales, que bloquea la β -galactosa mediante la unión de estos restos.

20 También se describe un método para aumentar el suministro de genes de un vector AAV9 en una célula que tiene glicanos de superficie con ácido siálico terminal y restos de β -galactosa penúltimos suministrando a un sujeto una combinación que comprende una neuraminidasa y un vector AAV9, comprendiendo dicho vector además un minigén que tiene repeticiones terminales invertidas de AAV y un gen heterólogo unido operativamente a secuencias reguladoras que dirigen su expresión en una célula hospedadora.

25 En otro aspecto, la invención proporciona un vector AAV9 recombinante modificado para disminuir o eliminar sustancialmente la capacidad natural del AAV9 de tipo silvestre (wt) para transducir la vía respiratoria conductora, teniendo dicho vector una cápside de AAV9 en la que un aminoácido de AAV9 natural seleccionado del grupo que consiste en: las posiciones 271, 446 y 470 basadas en las posiciones de la SEQ ID NO: 1, se reemplaza por una alanina.

30 En un ejemplo, la composición proporciona además un vector AAV9 mutante en el que se reduce o elimina sustancialmente la capacidad natural de AAV9 de tipo silvestre (wt) para transducir las vías respiratorias conductoras, pero se conserva la transducción de hígado y corazón similar a la de AAV9 de tipo silvestre. En un ejemplo, el AAV mutante tiene una cápside de AAV9 en la que se reemplaza el aminoácido natural en la posición 470 (Asn). En un ejemplo, el reemplazo es una alanina. En otro ejemplo, el AAV mutante tiene una cápside de AAV9 en la que se reemplaza el aminoácido natural en la posición 446 (Tyr). En un ejemplo, el reemplazo es una alanina. En otro ejemplo más, el AAV mutante tiene una cápside de AAV9 en la que se reemplaza el aminoácido natural en la posición 271 (Asp). En un ejemplo, el aminoácido se reemplaza con alanina.

35 También se describe un método de cambio de direccionamiento de un vector AAV9 al epitelio de las vías respiratorias mientras se conserva su capacidad de transducir el hígado y el corazón modificando uno o más de los aminoácidos en las posiciones 271, 446 y 470 a Alanina u otro aminoácido, es decir, preferentemente un aminoácido con una cadena lateral pequeña no cargada. En otro ejemplo, el aminoácido tiene una cadena lateral pequeña con un grupo metilo que no afecta la conformación del sitio de unión.

40 También se describe un vector de AAV que tiene una cápside de AAV modificada por ingeniería para contener un dominio de unión a galactosa de AAV9. En un ejemplo, la cápside de AAV modificada por ingeniería contiene el Y446, N470, A472 y V472 de AAV9 y D271, N272 y W503 de AAV9 insertados en la ubicación de aminoácidos correspondiente del AAV9 precursor.

45 En otro aspecto más, la invención proporciona un método para aislar un vector viral de virus adenoasociado (AAV) que tiene una cápside de un AAV de clado F que tiene un dominio de unión a β -galactosa, comprendiendo dicho método: exponer una muestra que comprende el vector viral del virus adenoasociado (AAV) que tiene una cápside de un AAV de clado F para poner en contacto con una molécula que comprende β -galactosa que se ha unido a un soporte

sólido, por lo que la diana de purificación que tiene un sitio de unión para β -galactosa se une selectivamente mediante la molécula; lavar el soporte sólido para eliminar el material de la muestra que no está unido específicamente al soporte sólido; y separar el vector viral del soporte sólido.

5 En una realización adicional, la invención proporciona una composición que comprende una combinación de (a) una neuraminidasa, (b) un vector de virus adenoasociado (AAV) que tiene una cápside de AAV de Clado F que tiene un dominio de unión a β -galactosa de la superficie celular, comprendiendo dicho vector además un minigén que tiene repeticiones terminales invertidas de AAV y un gen heterólogo unido operativamente a secuencias reguladoras que dirigen su expresión en una célula hospedadora y (c) un transportador farmacéuticamente aceptable.

10 También se describe una composición que comprende una combinación de (a) una lectina, (b) un vector de virus adenoasociado (AAV) que tiene una cápside de AAV9 y (c) un transportador farmacéuticamente aceptable.

15 Estos y otros aspectos de la invención serán fácilmente evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de la invención.

Breve descripción de la invención

20 Las figs. 1A - 1C proporcionan los resultados de un estudio de la unión de AAV a glicanos desprovistos de ácido siálico (SA). La Fig. 1A es un esquema de glicanos N- y O-unidos para cada tipo de célula o tratamiento con enzimas. La Fig. 1B muestra los resultados cuando se eliminó el SA de la superficie de las células Pro-5 mediante tratamiento con neuraminidasa (NA) y se aplicaron los vectores a las células tratadas y no tratadas con NA y se evaluaron para determinar su unión. Se seleccionaron cápsides vacías de AAV9 para determinar su unión a 465 glicanos diferentes basándose en las unidades de fluorescencia relativa promedio (presentadas en UFR) y se identificaron los cinco glicanos principales que se unieron a AAV9 (no se muestra). La figura 1C muestra las estructuras de los cinco glicanos principales y sus dibujos representativos. %CV: coeficiente de variación (la relación entre la desviación estándar de los datos y la media) expresada en porcentaje.

25 Las figuras 2A - 2F muestran los resultados de un estudio de la dependencia de AAV9 sobre galactosa para la unión y transducción de células CHO. Los AAV 2, 6 o 9 que expresaban ffLuc se agregaron a las células Pro-5, Lec-2 o Lec-8 y se incubaron a 4 °C durante 1 hora y se aisló el ADN total para determinar las copias del genoma unidas por qPCR (Fig. 2A) o se incubaron las células a 37 °C durante 48 horas y se analizaron para determinar la expresión de ffLuc (Fig. 2B). Se aplicaron AAV2 y AAV9 a células Pro-5 tratadas con NA en presencia de varias lectinas para competir por la unión (Fig. 2C) o transducción (Fig. 2D) de AAV. No se utilizó RCA en estudios de transducción debido a su toxicidad para las células. Se añadieron AAV2 y AAV9 a células Pro-5 que se trataron con NA o con NA y β -galactosidasa (NA y β -gal) para evaluar la unión (Fig. 2E) y la transducción (Fig. 2F) de AAV. ffLuc, luciferasa de luciérnaga; URL, unidades relativas de luz.

30 Las figs. 3A y 3B muestran los resultados de los estudios de los aminoácidos de la cápside de AAV9 requeridos para la unión a galactosa. Fig. 3A. Los aminoácidos específicos únicos para AAV9 que contienen cadenas laterales cargadas o polares se mutaron a alanina (A) para identificar a los responsables de la unión a galactosa. Se construyeron catorce vectores mutantes y se nombraron de acuerdo con el aminoácido natural y su posición específica, seguido del nuevo aminoácido alanina, A. Se analizaron los mutantes para determinar su unión a las células Pro-5, Lec-2 y Lec-8, en comparación con AAV9. El vector se añadió (5×10^9 CG) a cada línea celular y se incubó a 4 °C durante 1 hora. Tras el lavado, se aisló el ADN total para determinar las CG del vector unidas mediante PCR cuantitativa. Se determinó que N470 era necesario para la unión a galactosa de AAV9. FIG. 3B. Posteriormente, diecinueve aminoácidos localizados cerca de N470 se mutaron a alanina para examinar el efecto sobre la unión a galactosa de AAV9. Además, se produjeron otros cuatro mutantes que contenían mutaciones de los aminoácidos no polares A472 o V473 a serina o ácido aspártico. La unión de estos vectores mutantes se evaluó como se describe anteriormente. Se encontró que D271, N272, Y446 y W503, así como A472 y V473, son importantes para la unión a galactosa de AAV9. Los datos se muestran como media + DE.

35 Las figs. 4A y 4B proporcionan la eficacia de transducción *in vitro* de vectores mutantes. Se agregaron los cinco mutantes que perdieron la capacidad de unirse a galactosa (N470A, D271A, N272A, Y446A y W503A), así como dos mutantes que conservaron la unión a galactosa (S469A y E500A) y un vector AAV9 control, todos expresando ffLuc, a células Lec-2 (Fig. 4A) o Pro-5 (Fig. 4B) a 109 CG/pocillo (MOI = 104) y se midió la expresión de ffLuc 48 horas más tarde. Los datos se muestran como media + DE. URL, unidades relativas de luz.

40 La Fig. 5 es un gráfico lineal que muestra los resultados de un estudio *in vivo* del efecto del tratamiento previo con neuraminidasa en la expresión del transgén en la nariz después de la instalación de rAAV2/9. Los resultados se muestran como flujo radiante total (fotones por segundo (f/s) de luciferasa como imagen de luciferina por vía intranasal en los días 1, 3, 7, 14, 21 y 28 (número de días (tiempo) después de la infección).

60 Descripción detallada de la invención

Se describe un enfoque farmacológico para modificar la disponibilidad del receptor de AAV9 en una célula diana y para modificar la eficacia del vector. Este enfoque fue posible debido al descubrimiento de los inventores de que la β -galactosa terminal es el receptor primario para AAV9. Para mayor comodidad a lo largo de esta memoria descriptiva, se hace referencia a AAV9. Sin embargo, se entenderá que se puede sustituir por otro AAV que contenga el dominio de unión de la cápside del AAV9 para β -galactosa terminal de la superficie celular o por un AAV que contenga otro

dominio de unión de la cápside del AAV para β -galactosa terminal de la superficie de la célula, por ejemplo, otro AAV de Clado F. Adicionalmente, los métodos y composiciones descritos en el presente documento son útiles para un vector que es una partícula viral (es decir, una cápside de AAV que tiene empaquetadas en la misma, secuencias genómicas que se suministran a una célula hospedadora después de la captación del vector viral) así como para vaciar las cápsides de AAV9 (una cápside de AAV intacta sin secuencias empaquetadas en la misma). Además, se anticipa que la invención estará disponible tanto para cápsides de tipo silvestre como modificadas.

En un aspecto, se proporciona un vector de AAV que tiene una cápside de AAV modificada para contener un dominio de unión a galactosa de AAV9, que comprende un compartimento en la superficie exterior de las protuberancias hacia a los ejes de orden 2 y de orden 5 de la cápside de AAV que están formadas por una región variable I. En una realización, la cápside de AAV modificada contiene el Y446 (dominio conservado inmediatamente antes de la región variable (VR) IV), N470 (VR IV), A472 (VR IV) y V473 (VR IV) de AAV9 y D271 (VR I), N272 (VR I) y W503 (VR V) de AAV9 insertados en la ubicación de aminoácidos correspondiente del AAV9 precursor. Si bien el AAV precursor puede tener uno o más de estos aminoácidos de forma natural, no se une de forma natural a la galactosa ni contiene todos estos aminoácidos de forma natural. Por ejemplo, Y446, D271 y N272 se conservan entre muchos serotipos; mientras que N470 no. Por tanto, una cápside de AAV modificada puede requerir solamente la modificación por ingeniería del N470 (basándose en la numeración de posición de AAV9). Sin embargo, tal cápside de AAV puede requerir la modificación por ingeniería de uno o más de los aminoácidos anteriores para proporcionar el dominio de unión de AAV9. En un aspecto, el AAV9 modificado por ingeniería deriva de un AAV que en su tipo silvestre tiene unión al ácido siálico, pero debido a la modificación por ingeniería de la galactosa, ahora carece de unión al ácido siálico debido al impedimento estérico.

También se divulga un método para no dirigir un vector AAV9 al epitelio de las vías respiratorias mientras se conserva su capacidad de transducir el hígado y el corazón modificando uno o más de los aminoácidos en las posiciones 271, 446 y 470 (región variable IV) a Alanina u otro aminoácido. En un ejemplo, el aminoácido que reemplaza al aminoácido de tipo silvestre es un aminoácido con una cadena lateral pequeña y no cargada. En otro ejemplo, el aminoácido tiene una cadena lateral con un grupo metilo, por ejemplo, Val, Ile y Leu. En otro ejemplo más, se selecciona otro aminoácido adecuado que no afecta a la conformación del sitio de unión de una manera que elimine la función de unión a galactosa, por ejemplo, Arg, His, Lys, Asp, Glu, Ser, Thr, Asp, Gln, Cys, Ala, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Tyr, Trp. En un ejemplo, el aminoácido se selecciona de un grupo que excluye Pro.

También se proporcionan vectores AAV9 mutantes que tienen eficacias de direccionamiento que son diferentes del AAV9 de tipo silvestre, que se dirige a las células de las vías aéreas, el corazón y el hígado. En un ejemplo, tal vector AAV9 mutante cambia el direccionamiento al epitelio de las vías respiratorias mientras se conserva su capacidad de transducir el hígado y el corazón modificando uno o más de los aminoácidos en las posiciones 271, 446 y 470 a Alanina u otro aminoácido. En una realización, el aminoácido que reemplaza al aminoácido de tipo silvestre es un aminoácido con una cadena lateral pequeña y no cargada. En otro ejemplo, el aminoácido tiene una cadena lateral con un grupo metilo, por ejemplo, Val, Ile y Leu. En otro ejemplo más, se selecciona otro aminoácido adecuado que no afecta a la conformación del sitio de unión de una manera que elimine la función de unión a galactosa, por ejemplo, Arg, His, Lys, Asp, Glu, Ser, Thr, Asp, Gln, Cys, Ala, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Tyr, Trp. En un ejemplo, el aminoácido se selecciona de un grupo que excluye Pro.

En un ejemplo, se proporciona un vector AAV9 mutante en el que se reduce o elimina sustancialmente la capacidad natural de AAV9 de tipo silvestre (wt) para transducir la vía respiratoria conductora, pero se conserva la transducción de hígado y corazón similar a la de AAV9 de tipo silvestre. En un ejemplo, el AAV mutante tiene una cápside de AAV9 en la que se reemplaza el aminoácido natural en la posición 470 (Asn). En un ejemplo, el reemplazo es una alanina. En otro ejemplo, el AAV mutante tiene una cápside de AAV9 en la que se reemplaza el aminoácido natural en la posición 446 (Tyr). En un ejemplo, el reemplazo es una alanina. En otro ejemplo más, el AAV mutante tiene una cápside de AAV9 en la que se reemplaza el aminoácido natural en la posición 271 (Asp). En un ejemplo, el aminoácido se reemplaza con alanina.

I. Definiciones

Un clado F es un grupo de AAV que están filogenéticamente relacionados con AAV9, hu.14/AAV9 [Número de acceso de GenBank AY530579], hu.31 [AY530596] y hu.32 [N.º de acceso de GenBank AY530597] según lo determinado utilizando un algoritmo de Unión de Vecinos mediante un valor de arranque del 75% (de al menos 1000 repeticiones) y una medida de la distancia de la corrección de Poisson de no más de 0,05, basada en la alineación de la secuencia de aminoácidos vp1 de AAV. El algoritmo de Unión de Vecinos se ha descrito ampliamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, M. Nei y S. Kumar, *Molecular Evolution and Phylogenetics* (Oxford University Press, New York (2000)). Hay programas informáticos disponibles que se pueden usar para implementar este algoritmo. Por ejemplo, el programa MEGA v2.1 implementa el método de Nei-Gojobori modificado. Usando estas técnicas y programas informáticos y la secuencia de una proteína de la cápside vp1 de AAV, un experto en la materia puede determinar fácilmente si un AAV seleccionado está contenido en uno de los clados identificados en el presente documento, en otro clado o si está fuera de estos clados.

Los AAV de Clado F pueden ser cápsides vp1 de AAV de origen natural. Sin embargo, los AAV no están limitados a los AAV de origen natural. El clado puede abarcar AAV de origen no natural, incluyendo, sin limitación, recombinante,

modificado o alterado, modificado por ingeniería, quimérico, híbrido, sintético, artificial, etc., Los AAV que están relacionados filogenéticamente según se determina utilizando un algoritmo de Unión de Vecinos al menos el 75% (de al menos 1000 repeticiones) y una medición de la distancia de corrección de Poisson de no más de 0.05, basada en la alineación de la secuencia de aminoácidos vp1 de AAV.

5 En otro ejemplo, un AAV recombinante puede ser de un clado distinto al del AAV de Clado F que tiene una cápside que se ha modificado genéticamente para contener el dominio de unión de AAV9 que se une a la β -galactosa terminal de la superficie celular.

10 En otro ejemplo, un AAV utilizado en la presente invención es un vector de AAV que comprende una cápside que es al menos un 95% idéntica a la proteína vp3 de AAV9 (aminoácidos 203 a 736 de la SEQ ID NO: 1), al menos un 95% idéntica a la vp2 de AAV9 (aproximadamente aa 138 a 736 de la SEQ ID NO: 1) y/o al menos el 95% idéntico a la cápside vp1 de longitud completa de aav9 (aminoácidos 1 a 736 o 2 a 736 de la SEQ ID NO: 1). En otro ejemplo, el AAV es aproximadamente el 96%, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 % o aproximadamente el 99 %, para vp1, vp2 y/o vp3 de AAV9 de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1) y contiene el dominio de unión a la superficie celular de AAV9 para β -galactosa. Un experto en la materia entenderá que, debido a que el dominio vp3 contiene la mayoría de la región variable, es posible que un AAV tenga una identidad del 95% con AAV9 sobre la vp1 de AAV9, mientras que tiene una identidad más alta con la vp3 de AAV9. En un ejemplo, el AAV utilizado para preparar un vector de AAV tiene una cápside que es 100% idéntica a la vp1, vp2 y/o vp3 de AAV9. En otro ejemplo más, el AAV utilizado para preparar un vector de AAV tiene una cápside de AAV9, con la excepción de que contiene una o más mutaciones como se define en el presente documento.

25 La expresión "homología sustancial" o "similitud sustancial", cuando se refiere a aminoácidos o fragmentos de los mismos, indica que, cuando se alinean de manera óptima con las inserciones o deleciones de aminoácidos apropiadas con otro aminoácido (o su cadena complementaria), existe una identidad de secuencia de aminoácidos en al menos aproximadamente el 95 al 99% de las secuencias alineadas. Preferentemente, la homología es sobre la secuencia de longitud completa o una proteína de la misma, por ejemplo, una proteína cap, una proteína rep o un fragmento de las mismas que tiene al menos 8 aminoácidos o, más deseablemente, una longitud de al menos 15 aminoácidos. En el presente documento, se describen ejemplos de fragmentos adecuados.

30 Por la expresión "altamente conservado" se entiende al menos 80% de identidad, preferentemente al menos 90% de identidad y más preferentemente, más del 97% de identidad. La identidad se determina fácilmente por un experto en la materia recurriendo a algoritmos y programas informáticos conocidos por los expertos en la materia.

35 Generalmente, cuando se hace referencia a "identidad", "homología" o "similitud" entre dos virus adenoasociados diferentes, la "identidad", "homología" o "similitud" se determina en referencia a secuencias "alineadas". Secuencias "alineadas" o "alineaciones" se refiere a múltiples secuencias de ácido nucleico o secuencias de proteínas (aminoácidos), que con frecuencia contienen correcciones por bases o aminoácidos ausentes o adicionales en comparación con una secuencia de referencia. Las expresiones "identidad de secuencia", "porcentaje de identidad de secuencia" o "porcentaje idéntico" en el contexto de las secuencias de ácidos nucleicos se refieren a los restos en las dos secuencias que son iguales cuando se alinean para obtener la máxima correspondencia. La longitud de la comparación de identidad de secuencia puede ser sobre la longitud completa del genoma, se desea la longitud completa de una secuencia que codifica un gen o un fragmento de al menos aproximadamente 500 a 5000 nucleótidos. Sin embargo, también puede desearse la identidad entre fragmentos más pequeños, por ej. de al menos aproximadamente nueve nucleótidos, generalmente al menos aproximadamente 20 a 24 nucleótidos, al menos aproximadamente 28 a 32 nucleótidos, al menos aproximadamente 36 o más nucleótidos. De forma similar, el "porcentaje de identidad de secuencia" puede determinarse fácilmente para secuencias de aminoácidos, sobre la longitud completa de una proteína o un fragmento de la misma. De manera adecuada, un fragmento tiene una longitud de al menos aproximadamente 8 aminoácidos y puede tener hasta aproximadamente 700 aminoácidos. En el presente documento, se describen ejemplos de fragmentos adecuados.

Las alineaciones se realizan utilizando cualquiera de una variedad de Programas de Alineación de Secuencias Múltiples disponibles pública o comercialmente. Los ejemplos de tales programas incluyen, "Clustal W", "CAP Sequence Assembly", "MAP" y "MEME", a los que se puede acceder a través de los servidores web en Internet. Los expertos en la materia conocen otras fuentes para tales programas. De manera alternativa, también se utilizan utilidades de Vector NTI. También hay una serie de algoritmos conocidos en la técnica que se pueden usar para medir la identidad de secuencia de nucleótidos, incluidos aquellos contenidos en los programas descritos anteriormente. Como otro ejemplo, las secuencias de polinucleótidos se pueden comparar utilizando Fasta™, un programa en GCG Versión 6.1. Fasta™ proporciona alineaciones y porcentajes de identidad de secuencia de las regiones de mejor solapamiento entre las secuencias de consulta y de búsqueda. Por ejemplo, el porcentaje de identidad de la secuencia entre las secuencias de ácido nucleico se puede determinar utilizando Fasta™ con sus parámetros predeterminados (un tamaño de palabra de 6 y el factor NOPAM para la matriz de puntuación), como se proporciona en la versión 6.1 de GCG. Los programas de alineación de secuencias múltiples también están disponibles para las secuencias de aminoácidos, por ejemplo, los programas "Clustal X", "MAP", "PIMA", "MSA", "BLOCKMAKER", "MEME" y "Match-Box". Generalmente, cualquiera de estos programas se utiliza con la configuración predeterminada, aunque un experto en la materia puede modificar esta configuración según sea necesario. De manera alternativa, un experto en la materia

puede utilizar otro algoritmo o programa informático que proporcione al menos el nivel de identidad o alineación que proporcionan los algoritmos y programas a los que se hace referencia. Véase, por ejemplo, JD Thomson et al, (1999) Nucl. Acids. Res., "A comprehensive comparison of multiple sequence alignments", 27(13):2682-2690.

5 El término "serotipo" es una distinción con respecto a un AAV que tiene una cápside que es serológicamente distinta de otros serotipos de AAV. El carácter distintivo de la serología se determina sobre la base de la falta de reactividad cruzada entre los anticuerpos contra el AAV en comparación con otros AAV. La reactividad cruzada se mide generalmente en un ensayo de anticuerpos neutralizantes. Para este ensayo, se genera suero policlonal contra un AAV específico en un conejo u otro modelo animal adecuado usando los virus adenoasociados. En este ensayo, el suero generado contra un AAV específico se prueba, a continuación, en su capacidad para neutralizar el mismo (homólogo) o un AAV heterólogo. La dilución que logra una neutralización del 50% se considera el título de anticuerpos neutralizantes. Si para dos AAV, el cociente del título heterólogo dividido por el título homólogo es inferior a 16 de una manera recíproca, esos dos vectores se consideran como el mismo serotipo. Por el contrario, si la proporción del título heterólogo sobre el título homólogo es 16 o más de manera recíproca, los dos AAV se consideran serotipos distintos.

15 Como se usa en el presente documento, una β -galactosa "terminal" es un receptor de la superficie celular para un AAV9 que tiene el sitio de unión de tipo silvestre que está expuesto de manera tal que esté disponible estéricamente o de otra manera para unirse al dominio de unión a galactosa de AAV9.

20 A menos que se especifique de otro modo, el término "aproximadamente" cuando se usa para modificar un número significa una variación de $\pm 10\%$.

25 Tal y como se usa en toda la memoria descriptiva y las reivindicaciones, las expresiones "que comprende" y "que incluye" incluyen otros componentes, elementos, números enteros, etapas y similares. Por el contrario, la expresión "que consiste" y sus variantes son exclusivos de otros componentes, elementos, números enteros, etapas y similares.

II. REGÍMENES DE TRATAMIENTO

30 Se divulga un método para alterar el direccionamiento y/o la eficacia de captación celular de un vector viral de virus adenoasociado (AAV) que tiene una cápside de AAV9. El método comprende suministrar a un sujeto una composición que modifica la disponibilidad de la β -galactosa para unirse a un vehículo de suministro basado en AAV9. En un ejemplo, la superficie de la célula diana deseada contiene un glicano que tiene un resto de ácido siálico terminal y un penúltimo resto de β -galactosa, cuyo glicano se modifica por la invención para exponer el resto de β -galactosa.

35 En un ejemplo, el método comprende suministrar el vector viral de AAV a un sujeto en combinación con una neuraminidasa (NA), por lo que la neuraminidasa escinde el ácido siálico terminal en la superficie celular y aumenta la eficacia de la captación de AAV por parte de la célula. El sujeto puede tratarse previamente con la neuraminidasa.

40 Por tratamiento previo se entiende que el tratamiento (por ejemplo, neuraminidasa) se suministra al sujeto antes de la terapia mediada por AAV9. Generalmente, esto implica la administración del tratamiento previo antes de la administración de la terapia mediada por AAV9. Sin embargo, en determinados ejemplos, el transgén codificado por un vector AAV9 puede estar bajo el control de un promotor regulable que se activa después del tratamiento previo. En tal ejemplo, el vector AAV9 puede administrarse antes o sustancialmente de forma simultánea con, la administración del tratamiento previo, pero la administración del agente activador para el promotor constitutivo es posterior al tratamiento previo.

45 Las neuraminidasas, también conocidas como sialidasas, se dirigen específicamente al ácido siálico para la escisión y pueden adquirirse comercialmente, u obtenerse de una variedad de fuentes. En un aspecto, la neuraminidasa es una exoneuraminidasa, es decir, se dirige específicamente a los ácidos siálicos terminales para la escisión, al contrario que a los ácidos siálicos internos. En un aspecto, una exoneuraminidasa actúa en la hidrólisis de los enlaces α -2 \rightarrow 3)-, α -2 \rightarrow 6)-, α -2 \rightarrow 8)- glicosídicos de los restos de ácido siálico terminales. Ejemplos de neuraminidasas útiles en la invención incluyen, por ejemplo, una neuraminidasa bacteriana, neuraminidasas víricas y de mamíferos. La neuraminidasa (acil-neuraminil hidrolasa: EC3.2.1.18) puede provenir de cualquier fuente incluyendo, pero sin limitación, *Arthrobacter ureafaciens*, *Vibrio cholerae*, *Clostridium perfringens* o de fuentes de mamíferos. En un aspecto, la neuraminidasa es una neuraminidasa bacteriana tal como neuraminidasa tipo III de *Vibrio cholerae* (Sigma). Sin embargo, se pueden seleccionar otros tipos de neuraminidasas. En otro aspecto, se puede seleccionar una neuraminidasa vírica, por ejemplo, una neuraminidasa de gripe. En otro aspecto más, una neuraminidasa de mamífero puede seleccionarse entre, por ejemplo, ser humano, roedor, simio u otra fuente de mamífero.

60 La neuraminidasa puede formularse como un líquido o puede ser como un sólido, por ejemplo, en el que la neuraminidasa se mezcla con excipientes farmacéuticos convencionales, incluyendo, por ejemplo, embebiéndose o mezclándose en una matriz biodegradable o bioerosionable. La matriz puede ser una matriz de liberación temporal. Estas matrices son bien conocidas por aquellos expertos en la materia. La neuraminidasa se puede administrar por inyección o por vía sublingual. En un ejemplo, el vehículo es una solución acuosa (por ejemplo, una solución salina, incluida la solución salina tamponada, u otro transportador líquido adecuado) que está contenido dentro de un recipiente inerte. En otra variación, la composición está en la forma de un supositorio. La forma líquida de la

composición se puede administrar a través de métodos convencionales, incluidas las vías intravenosa, intramuscular y subcutánea, vías sublingual o intranasal. En un ejemplo, el transportador es fenol al 0,1% a 0,4% en cloruro de sodio al 0,9% (USP).

5 La neuraminidasa puede administrarse a una dosis de, por ejemplo, aproximadamente 300 U a aproximadamente 5000 U de neuraminidasa para, es decir, el equivalente a aproximadamente 15 mg a 250 mg de neuraminidasa por dosis. De manera alternativa, se pueden usar dosis más bajas, como en el intervalo de aproximadamente 0,0001 mg a 0,01 mg. De manera alternativa, se pueden usar cantidades entre estos dos intervalos, por ejemplo, de 0,01 mg a aproximadamente 250 mg.

10 En un ejemplo, la invención hace posible un suministro de genes mediado por AAV en el que se suministra a un sujeto un vector viral AAV9 (o un Clado F o un vector con un dominio de unión a células (galactosa) de AAV9) y la neuraminidasa de forma sustancialmente simultánea. La neuraminidasa puede formularse por separado del vector de AAV y/o suministrarse a través de una ruta diferente, pero sustancialmente al mismo tiempo. De manera alternativa, el vector viral de AAV se suministra al sujeto en un transportador que además comprende la neuraminidasa.

15 Aunque se anticipa que un cuerpo eliminará de forma natural una enzima tal como la neuraminidasa de modo que su efecto sea solo temporal, en un ejemplo, se puede suministrar un inhibidor de la neuraminidasa para neutralizar cualquier efecto persistente de la neuraminidasa. Los inhibidores de neuraminidasa adecuados son conocidos en la técnica y pueden incluir fármacos antivirales que están disponibles comercialmente, por ejemplo, Oseltamivir (Tamiflu), Zanamivir (Relenza), Lanimavir (Inavir) y Peramivir. Los regímenes de posología típicos para un inhibidor de la neuraminidasa sistémica, tal como el oseltamivir, son aproximadamente 75 mg por vía oral, dos veces al día durante 5 días o más, según lo prescrito. Sin embargo, para su uso en los métodos descritos en el presente documento, puede desearse un régimen de dosificación más corto, por ejemplo, 1-2 días y/o una dosis diaria más baja o más alta. De manera alternativa, un inhibidor de la neuraminidasa inhalado tal como el zanamivir puede ser deseado para aplicaciones relacionadas con los pulmones. Por lo general, las dosis de este fármaco son de 10 mg por inhalación, dos veces al día durante 5 días o más, según lo prescrito. Sin embargo, para su uso en los métodos descritos en el presente documento, puede desearse un régimen de dosificación más corto, por ejemplo, 1-2 días y/o una dosis diaria más baja o más alta. De manera alternativa, se puede seleccionar otro tipo de inhibidor de la neuraminidasa.

20 En otro aspecto, los vectores de AAV se redirigen lejos de un primer subconjunto de células que tienen receptores de clado F mediante la eliminación funcional de un resto de β -galactosa de la superficie celular expuesta en el primer subconjunto de células que tienen receptores para AAV9 (por ejemplo, glicanos de superficie celular que tienen restos de β -galactosa terminal) y el AAV se redirige, de este modo, a un segundo subconjunto de células en el sujeto que tiene el receptor de clado F y/o el número de AAV que entran en contacto con el segundo subconjunto de células aumenta, aumentado, de este modo, la captación por estas células. En un ejemplo, una β -galactosa se suprime enzimáticamente en un primer subconjunto de células que tienen los receptores de superficie celular de AAV, reduciendo o eliminando, de este modo, la captación de AAV por dicho subconjunto de células y redirigiendo el AAV a un segundo subconjunto de células en el sujeto que tienen receptores de AAV9.

30 En un ejemplo, el resto que bloquea funcionalmente el dominio de unión en la superficie del primer subconjunto de células se suministra localmente al primer subconjunto de células. Generalmente, este efecto de bloqueo permanece relativamente localizada en las células ubicadas proximales al sitio de entrega. Por ejemplo, el suministro local puede realizarse, por ejemplo, mediante inhalación, instalación intranasal, inyección directamente en una articulación o suministro directamente en el ojo, así como por una variedad de otros métodos conocidos en la técnica.

35 Se puede suministrar un compuesto para eliminar el efecto de la galactosidasa, la lectina u otro resto bloqueante. Por ejemplo, se puede suministrar una anti- β -galactosidasa al sujeto. Por ejemplo, se puede utilizar un compuesto tal como GT-2558 [US 4.497.797] o fenil etil-beta-D-tiogalactopiranosido [PETG]. De manera alternativa, se puede suministrar otro resto para acelerar la eliminación de la β -galactosidasa o lectina. Sin embargo, se anticipa que el cuerpo del sujeto eliminará fácilmente el resto (por ejemplo, la enzima galactosidasa).

40 En un ejemplo, la β -galactosa se elimina enzimáticamente suministrando galactosidasa al primer subconjunto de células en combinación con los vectores de AAV. Puede usarse una variedad de β -galactosidasas. En un ejemplo, se puede usar la isoforma 1 [GLB1, RefSeq: NM 000404; UniProt P16278. Las β -galactosidasas adecuadas también están disponibles comercialmente, por ejemplo, de NewEngland Biolabs, Roche Applied Science y Sigma Aldrich (de fuentes de *E. Coli*). Esta enzima puede formularse y suministrarse como se describe anteriormente para la neuraminidasa. Se pueden utilizar dosis de β -galactosidasas en el intervalo de aproximadamente 0,0001 mg a aproximadamente 250 mg por dosis o aproximadamente 0,001 mg a aproximadamente 100 mg por dosis. Estas dosis pueden ajustarse según se necesite o desee. La β -galactosidasa funciona escindiendo la galactosa y reduciendo significativamente o eliminando sustancialmente la captación de AAV9 por aquellas células en las que se escindió la galactosa. De esta manera, el vector AAV9 se redirige a otras células que conservan la galactosa de la superficie celular.

45 En otro ejemplo, una lectina que se une a los restos de β -galactosa y, en particular, a los restos de β -galactosa terminal, se suministra al sujeto en combinación con un vector de AAV como se describe en el presente documento. Entre las

lectinas útiles se encuentran las lectinas dependientes de calcio (tipo C), tales como la lectina de tipo C humana de receptores eliminadores (SRCL) y una lectina dependiente de calcio (tipo C) de macrófagos humana. Otras lectinas útiles incluyen lectina de *Erythrina Cristagalli* (ECL) y una lectina de galactosa de macrófagos (MGL). Otras lectinas pueden incluir lectina aglutinina de cacahuete o aglutinina de germen de trigo. Algunas de estas lectinas se han descrito en la bibliografía y/o se pueden obtener a través de fuentes comerciales (por ejemplo, Vectorlabs). Tal como se describe en el presente documento, una lectina puede formularse en un transportador líquido adecuado y puede comprenderse en el intervalo de 200 a 10.000 µg/ml, tal como de 200 a 5000 µg/ml, por ejemplo de 200 a 3.000 µg/ml, tal como de 200 a 2000 µg/ml, por ejemplo de 200 a 1500 µg/ml de lectina.

En otro ejemplo más, se puede suministrar un anticuerpo antigalactosa terminal al sujeto.

Se conocen métodos para preparar vectores basados en AAV9 y otros vectores de AAV como se describen en el presente documento. Véase, por ejemplo, Solicitud de Patente Publicada de EE. UU. Número 2007/0036760 (15 de febrero de 2007). La divulgación no se limita al uso de AAV9 u otras secuencias de aminoácidos de AAV de clado F, sino que abarca péptidos y/o proteínas que contienen la unión de la β-galactosa terminal generada por otros métodos conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, por síntesis química, por otras técnicas sintéticas o por otros métodos. Las secuencias de cualquiera de las cápsides de AAV proporcionadas en el presente documento pueden generarse fácilmente usando una variedad de técnicas. Las técnicas de producción adecuada son bien conocidas por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Sambrook et al, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (Cold Spring Harbor, NY). De manera alternativa, los péptidos también se pueden sintetizar mediante los métodos bien conocidos de síntesis de péptidos en fase sólida (Merrifield, (1962) *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149; Stewart y Young, *Solid Phase Peptide Synthesis* (Freeman, San Francisco, 1969) pp. 27-62). Estos y otros métodos de producción adecuados están dentro del conocimiento de los expertos en la materia y no son una limitación de la presente divulgación.

Se conocen métodos para generar un virus adenoasociado recombinante (AAV), tal como se describe en el presente documento (por ejemplo, un AAV que tiene un dominio de unión celular para β-galactosa). Tal método implica cultivar una célula hospedadora que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica una cápside de AAV; un gen rep funcional; un minigén compuesto de, como mínimo, repeticiones terminales invertidas de AAV (ITR) y un transgén; y suficientes funciones auxiliares para permitir el empaquetado del minigén en la proteína de la cápside del AAV.

Los componentes requeridos para cultivarse en la célula hospedadora para empaquetar un minigén de AAV en una cápside de AAV pueden proporcionarse a la célula hospedadora en *trans*. De manera alternativa, una célula hospedadora estable que haya sido modificada por ingeniería para contener uno o más de los componentes requeridos utilizando métodos conocidos por los inventores puede proporcionar uno o más de los componentes requeridos (p. ej., minigén, secuencias *rep*, secuencias *cap* y/o funciones auxiliares). De forma más adecuada, dicha célula hospedadora estable contendrá los componente(s) requeridos bajo el control de un promotor inducible. Sin embargo, los componente(s) requeridos pueden estar bajo el control de un promotor constitutivo. Se proporcionan en el presente documento ejemplos de promotores inducibles y constitutivos adecuados, en el análisis de los elementos reguladores adecuados para su uso con el transgén. En otra alternativa más, una célula hospedadora estable seleccionada puede contener componente(s) seleccionados bajo el control de un promotor constitutivo y otros componente(s) seleccionados bajo el control de uno o más promotores inducibles. Por ejemplo, se puede generar una célula hospedadora estable que deriva de células 293 (que contienen funciones E1 auxiliares bajo el control de un promotor constitutivo), pero que contienen las proteínas rep y/o cap bajo el control de promotores inducibles. Un experto en la materia puede generar otras células hospedadoras estables adicionales.

El minigén, las secuencias *rep*, las secuencias *cap* y las funciones auxiliares requeridas para producir el AAVr 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 suministrarse mediante cualquier método adecuado, incluyendo aquellos descritos en el presente documento. Son conocidos por aquellos expertos en la manipulación de ácidos nucleicos los métodos utilizados para construir cualquier aspecto de la presente divulgación e incluyen la 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. De forma similar, son bien conocidos los métodos para generar viriones de AAVr y la selección de un método adecuado no es una limitación de la presente divulgación. Véase, por ejemplo, K. Fisher et al, (1993) *J. Virol.*, 70: 520-532 y patente de los Estados Unidos N.º 5.478.745.

A menos que se especifique de otro modo, las ITR de AAV y otros componentes de AAV seleccionados descritos en el presente documento, pueden seleccionarse fácilmente entre cualquier AAV. Estas ITR u otros componentes de AAV pueden aislarse fácilmente usando técnicas disponibles para los expertos en la materia a partir de una secuencia de AAV. Dicho AAV puede aislarse u obtenerse de fuentes académicas, comerciales o públicas (por ejemplo, la Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, VA). De manera alternativa, las secuencias de AAV pueden obtenerse a través de medios sintéticos u otros medios adecuados por referencia a secuencias publicadas tales como las que están disponibles en la bibliografía o en bases de datos tales como, por ejemplo, GenBank®, PubMed® o similares.

A. El Minigén

El minigén está compuesto por, como mínimo, un transgén y sus secuencias reguladoras y las repeticiones terminales invertidas (ITR) 5' y 3' de AAV. En un aspecto se utilizan las ITR de AAV de serotipo 2. Sin embargo, se pueden seleccionar ITR de otras fuentes adecuadas. Es este minigén que se empaqueta en una proteína de cápside y se suministra a una célula hospedadora seleccionada.

1. El transgén

El transgén es una secuencia de ácido nucleico, heteróloga a las secuencias del vector que flanquean el transgén, que codifica un polipéptido, proteína u otro producto de interés. La secuencia codificante de ácido nucleico está unida operativamente a componentes reguladores de una manera que permite la transcripción, traducción y/o expresión de transgén en una célula hospedadora.

La composición de la secuencia transgénica dependerá del uso al que se destinará el vector resultante. Por ejemplo, un tipo de secuencia transgénica incluye una secuencia informadora, que en la expresión produce una señal detectable. Estas secuencias codificantes, cuando se asocian con elementos reguladores que dirigen su expresión, proporcionan señales detectables por medios convencionales, incluidos ensayos enzimáticos, radiográficos, colorimétricos, de fluorescencia u otros ensayos espectrográficos, ensayos de clasificación de células activadoras de fluorescencia y ensayos inmunológicos, incluyendo ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) e inmunohistoquímica. Sin embargo, de manera deseable, el transgén es una secuencia no marcadora que codifica un producto que es útil en biología y medicina, tales como proteínas, péptidos, ARN, enzimas, mutantes negativos dominantes o ARNp catalíticos. Las moléculas de ARN deseables incluyen ARNt, ARNbc, ARN ribosómico, ARNp catalítico, ARNip, ARN de horquilla pequeña, ARN de corte y empalme en trans y ARNp antisentido. Un ejemplo de una secuencia de ARN útil es una secuencia que inhibe o extingue la expresión de una secuencia de ácido nucleico diana en el sujeto tratado. Generalmente, las secuencias diana adecuadas incluyen dianas oncológicas y enfermedades víricas. Véase, para ejemplos de tales dianas, las dianas oncológicas y los virus identificados a continuación en la sección relativa a los inmunógenos.

El transgén se puede usar para corregir o mejorar las deficiencias genéticas, que pueden incluir deficiencias en las que los genes normales se expresan a niveles inferiores a los normales o deficiencias en las que no se expresa el producto génico funcional. De manera alternativa, el transgén puede proporcionar un producto a una célula que no se expresa de forma natural en el tipo de célula o en el hospedador. Un tipo preferido de secuencia transgénica codifica una proteína o polipéptido terapéutico que se expresa en una célula hospedadora. La divulgación incluye además el uso de múltiples transgenes. En determinadas situaciones, se puede usar un transgén diferente para codificar cada subunidad de una proteína o para codificar diferentes péptidos o proteínas. Esto es deseable cuando el tamaño del ADN que codifica la subunidad de la proteína es grande, por ejemplo, para una inmunoglobulina, el factor de crecimiento derivado de las plaquetas o una proteína distrofina. Para que la célula produzca la proteína de múltiples subunidades, una célula se infecta con el virus recombinante que contiene cada una de las diferentes subunidades. De manera alternativa, diferentes subunidades de una proteína pueden estar codificadas por el mismo transgén. En este caso, un solo transgén incluye el ADN que codifica cada una de las subunidades, con el ADN de cada subunidad separado por un sitio interno de entrada al ribozima (IRES por sus siglas en inglés). Esto es deseable cuando el tamaño del ADN que codifica cada una de las subunidades es pequeño, por ejemplo, el tamaño total del ADN que codifica las subunidades y el IRES es menor de cinco kilobases. De manera alternativa a un IRES, el ADN se puede separar mediante secuencias que codifican un péptido 2A, que se escinde a sí mismo en un evento postraduccional. Véase, por ejemplo, ML Donnelly, et al, (Jan 1997) J. Gen. Virol., 78(Pt 1):13-21; S. Furler, S et al, (June 2001) Gene Ther., 8(11):864-873; H. Klump, et al., (May 2001) Gene Ther., 8 (10):811-817. Este péptido 2A es significativamente más pequeño que un IRES, lo que lo hace adecuado para su uso cuando el espacio es un factor limitante. Más a menudo, cuando el transgén es grande, consiste en subunidades múltiples o se suministran conjuntamente dos transgenes, el AAVr que porta el(los) transgén(es) o subunidades se administra conjuntamente para permitir que se concatamericen *in vivo* para formar un genoma de vector único. En tal aspecto, un primer AAV puede portar un casete de expresión que expresa un solo transgén y un segundo AAV puede portar un casete de expresión que expresa un transgén diferente para la expresión conjunta en la célula hospedadora. Sin embargo, el transgén seleccionado puede codificar cualquier producto biológicamente activo u otro producto, por ejemplo, un producto deseable para su estudio.

Un experto en la materia puede seleccionar fácilmente los transgenes adecuados. La selección de los transgenes no se considera una limitación de la presente invención.

2. Elementos Reguladores

Además de los elementos principales identificados anteriormente para el minigén, el vector también incluye elementos de control convencionales que están unidos operativamente al transgén de una manera que permite su transcripción, traducción y/o expresión en una célula transfectada con el plásmido vector o infectada con el virus producido por la divulgación. Tal como se usa en el presente documento, las secuencias "unidas operativamente" incluyen tanto las secuencias de control de la expresión que son contiguas con el gen de interés como las 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 iniciación, terminación, promotoras y potenciadoras de la transcripción; las señales de procesamiento del ARN eficaces tales como las señales de corte y empalme y las señales de poliadenilación (poliA); secuencias que estabilizan el ARNm citoplásmico; secuencias que potencian la eficacia de la traducción (*es decir*, secuencia consenso de Kozak); secuencias que potencian la estabilidad de la proteína; y cuando se desea, secuencias que potencian la secreción del producto codificado. Se conocen en la técnica y pueden utilizarse, un gran número de secuencias de control de la expresión, que incluyen promotores que son naturales, constitutivos, inducibles y/o específicos de tejido.

Los ejemplos de promotores constitutivos incluyen, sin limitación, el promotor LTR del virus del sarcoma de Rous retroviral (RSV), (opcionalmente con el potenciador del RSV), el promotor del citomegalovirus (CMV) (opcionalmente, con el potenciador del CMV) [véase, por ejemplo, Boshart et al., (1985) *Cell*, 41:521-530], el promotor SV40, el promotor de dihidrofolato reductasa, el promotor de β -actina, el promotor de fosfoglicerol quinasa (PGK) y el promotor de EF1 [Invitrogen]. Los promotores inducibles permiten la regulación de la expresión génica y se pueden regular por compuestos suministrados de forma exógena, por factores ambientales tales como temperatura o la presencia de un estado fisiológico específico, por ejemplo, fase aguda, un estado de diferenciación concreto de la célula o únicamente en células replicantes. Los promotores inducibles y los sistemas inducibles están disponibles a partir de una variedad de fuentes comerciales, incluyendo, sin limitación, Invitrogen, Clontech y Ariad. Se han descrito otros muchos sistemas y una persona experta en la materia puede seleccionarlos fácilmente. Ejemplos de promotores inducibles regulados por compuestos suministrados de forma exógena, incluyen, el promotor de metalotionina (MT) de oveja inducible por zinc, el promotor del virus del tumor de mama 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 ecdisona de insectos [No et al., (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:3346-3351], el sistema reprimible por tetraciclina [Gossen et al., (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:5547-5551], el sistema inducible por tetraciclina [Gossen et al., (1995) *Science*, 268:1766-1769, véase también Harvey et al., (1998) *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2:512-518], el sistema inducible por RU486 [Wang et al., (1997) *Nat. Biotech.*, 15:239-243 and Wang et al., (1997) *Gene Ther.*, 4:432-441] y el sistema inducible por rapamicina [Magari et al., (1997) *J. Clin. Invest.*, 100:2865-2872]. Otros tipos de promotores inducibles que pueden ser útiles en el contexto son aquellos que están regulados por un estado fisiológico específico, por ejemplo, la temperatura, fase aguda, un estado de diferenciación concreto de la célula o únicamente en células replicantes.

En otro aspecto se usará el promotor natural para el transgén. El promotor natural puede ser preferido cuando se desea que la expresión del transgén deba imitar la expresión natural. El promotor natural se puede usar cuando la expresión del transgén deba estar regulada temporalmente o en el desarrollo o de una manera específica de tejido o en respuesta a estímulos transcripcionales específicos. En un aspecto adicional, otros elementos de control de la expresión naturales, tales como elementos potenciadores, sitios de poliadenilación o secuencias consenso de Kozak, también pueden usarse para imitar la expresión natural.

Otro aspecto del transgén incluye un gen unido operativamente a un promotor específico de tejido. Por ejemplo, si se desea la expresión en el músculo esquelético, se debe utilizar un promotor activo en el músculo. Estos incluyen los promotores de los genes que codifican la β -actina esquelética, la miosina cadena ligera 2A, la distrofina, la creatina quinasa muscular, así como los promotores musculares sintéticos con actividades más altas que los promotores de origen natural (véase Li et al., (1999) *Nat. Biotech.*, 17:241-245). Ejemplos de promotores que son específicos de tejido son conocidos para el hígado (albúmina, Miyatake et al., (1997) *J. Virol.*, 71:5124-32; promotor del núcleo del virus de la hepatitis B, Sandig et al., (1996) *Gene Ther.*, 3:1002-9; alfafetoproteína (AFP), Arbutnot et al., (1996) *Hum. Gene Ther.*, 7:1503-14), osteocalcina ósea (Stein et al., (1997) *Mol. Biol. Rep.*, 24:185-96); sialoproteína ósea (Chen et al., (1996) *J. Bone Miner. Res.*, 11:654-64), linfocitos (CD2, Hansal et al., (1998) *J. Immunol.*, 161:1063-8; cadena pesada de inmunoglobulinas; cadena del receptor de linfocitos T), neuronales tal como el promotor de enolasa específico de neuronas (NSE) (Andersen et al., (1993) *Cell. Mol. Neurobiol.*, 13: 503 -15), gen de cadena ligera de neurofilamento (Piccioli et al., (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 5611-5) y el gen vgf específico de neuronas (Piccioli et al., (1995) *Neuron*, 15: 373-84), entre otros.

La combinación del transgén, el promotor/potenciador y los ITR de AAV de 5' y 3' se denomina "minigén" para facilitar la referencia en el presente documento. Proporcionado con las enseñanzas de la presente invención, el diseño de tal minigén puede hacerse recurriendo a técnicas convencionales.

3. Suministro del Minigén a una Célula Hospedadora de Empaquetamiento

El minigén se puede portar en cualquier vector adecuado, por ejemplo, un plásmido, que se suministra a una célula hospedadora. Los plásmidos útiles en esta divulgación pueden modificarse por ingeniería de manera tal que sean adecuados para la replicación y, opcionalmente, para la integración en células procariotas, células de mamíferos o ambas. Estos plásmidos (u otros vectores que portan la molécula ITR de AAV 3' homóloga de ITR de AAV 5') contienen secuencias que permiten la replicación del minigén en eucariotas y/o procariotas y marcadores de selección para estos sistemas. Los marcadores seleccionables o genes indicadores pueden incluir secuencias que codifican resistencia a geneticina, higromicina o purimicina, entre otras. Los plásmidos también pueden contener ciertos indicadores seleccionables o genes marcadores que pueden usarse para señalar la presencia del vector en células bacterianas, tal como la 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

amplicones u otros componentes de amplicones similares permiten una replicación episómica de alta copia en las células. Preferentemente, la molécula que porta el minigén se transfecta en la célula, donde puede existir de forma transitoria. De manera alternativa, el minigén (que porta la molécula ITR 3' homóloga de ITR de AAV 5') puede integrarse de manera estable en el genoma de la célula hospedadora, ya sea cromosómicamente o como un episoma.

5 En ciertos aspectos, el minigén puede estar presente en múltiples copias, opcionalmente en concatémeros de cabeza con cabeza, de cabeza con cola o de cola con cola. Se conocen técnicas de transfección adecuadas y pueden utilizarse fácilmente para suministrar el minigén a la célula hospedadora.

10 Generalmente, cuando se suministra el vector que comprende el minigén por transfección, el vector se suministra en una cantidad de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 100 µg de ADN, aproximadamente 10 µg a aproximadamente 50 µg de ADN a aproximadamente 1×10^4 células a aproximadamente 1×10^{13} células o aproximadamente 1×10^5 células. Sin embargo, las cantidades relativas de ADN vector a células hospedadoras pueden ajustarse, teniendo en cuenta factores tales como el vector seleccionado, el método de suministro y las células hospedadoras seleccionadas.

15 B. Células Hospedadoras de Empaquetamiento

Además del minigén, la célula hospedadora contiene las secuencias que dirigen la expresión de una nueva proteína de cápside del AAV de la invención (o una proteína de la cápside que comprende un fragmento de la misma) en la célula hospedadora y las secuencias rep de la misma fuente que la fuente de los ITR de AAV que se encuentran en el minigén o una fuente de complementación cruzada. La célula hospedadora de empaquetamiento también requiere funciones auxiliares para empaquetar el AAVr de la invención. Tales funciones auxiliares son bien conocidas en la técnica y no se duplicarán en el presente documento. De forma similar, se conocen métodos para producir vectores adecuados que tienen cápsides de AAV. [Véase, por ejemplo, la solicitud de Patente de los Estados Unidos Publicada N.º US 2007/0036760].

20 Por tanto, la divulgación proporciona además vectores generados usando las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos del AAV descrito en el presente documento. Dichos vectores son útiles para una variedad de propósitos, que incluyen para el suministro de moléculas terapéuticas y para su uso en regímenes de vacunas. Particularmente deseables para el suministro de moléculas terapéuticas son los AAV recombinantes que contienen cápsides del AAV descrito en el presente documento. Estas, u otras construcciones de vectores que contienen secuencias de AAV descritas en el presente documento se pueden usar en regímenes de vacunas, por ejemplo, para el suministro conjunto de una citoquina o para el suministro del inmunógeno en sí mismo.

30 Por tanto, conocidas las técnicas, un experto en la materia puede generar un AAVr que tenga una cápside de AAV de clado F, una cápside de AAV9 y/o un vector que tenga una cápside de AAV que comprenda un dominio de unión a β-galactosa de AAV9. En un ejemplo, se puede utilizar una cápside de longitud completa de un solo AAV, por ejemplo, hu.14/AAV9 [SEC ID NO: 1]. En otro ejemplo, se puede generar una cápside de longitud completa que contiene uno o más fragmentos de la cápside de AAV9 (por ejemplo, un fragmento que comprende el dominio de unión a β-galactosa de AAV9) fusionados en el marco con secuencias de otro AAV seleccionado o de porciones heterólogas (es decir, no contiguas) del mismo AAV. En otro ejemplo más, un vector con una cápside de AAV9 mutante o un AAV modificado por ingeniería para contener el dominio de unión a galactosa de AAV9 se ensamblan utilizando técnicas similares.

45 Los vectores recombinantes descritos anteriormente pueden suministrarse a las células hospedadoras de acuerdo con los métodos publicados. Los AAVr, preferentemente suspendido en un transportador fisiológicamente compatible, puede administrarse a un paciente mamífero humano o no humano. Un experto en la materia puede seleccionar fácilmente transportadores adecuados a la vista de la indicación para la cual se dirige el virus de transferencia. Por ejemplo, un transportador adecuado incluye una solución salina, que puede formularse con una variedad de soluciones tamponantes (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato). Otros transportadores ejemplares incluyen solución salina estéril, lactosa, sacarosa, fosfato de calcio, gelatina, dextrano, agar, pectina, aceite de cacahuete, aceite de sésamo y agua. La selección del transportador no es una limitación de la presente invención.

50 Opcionalmente, las composiciones de la invención pueden contener, además de los AAVr y el(los) transportador(es), 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.

60 Los vectores se administran en cantidades suficientes para transfectar las células y para proporcionar niveles suficientes de transferencia y expresión de genes para proporcionar un beneficio terapéutico sin efectos adversos indebidos o con efectos fisiológicos médicamente aceptables, que pueden determinar los expertos en la materia médica. Las rutas de administración convencionales y farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, suministro directo al órgano deseado (por ejemplo, el pulmón, corazón o cerebro), oral, inhalación, intranasal, intratraqueal, intraarterial, intraocular, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica y otras vías de administración parenteral. Las vías de administración pueden combinarse, si se desea.

65

Las dosis del vector viral dependerán principalmente de factores tales como la afección que se está tratando, la edad, el peso y la salud del paciente y, por lo tanto, pueden variar entre los pacientes. Por ejemplo, una posología humana terapéuticamente eficaz del vector viral está generalmente 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 del virus vector. Una posología humana preferida para el suministro a órganos grandes (por ejemplo, pulmón, músculo esquelético, corazón o pulmón) o el sistema nervioso central (por ejemplo, cerebro) puede ser de aproximadamente 5×10^{10} a 5×10^{13} genomas de AAV por 1 kg, en un volumen de alrededor de 1 a 100 ml. Una posología preferida para el suministro al ojo (por ejemplo, la retina) es de aproximadamente 5×10^9 a 5×10^{12} copias del genoma, en un volumen de aproximadamente 0,1 ml a 1 ml. La posología se ajustará para equilibrar el beneficio terapéutico frente a cualquier efecto secundario y dichas dosis pueden variar dependiendo de la aplicación terapéutica para la cual se emplea el vector recombinante. Los niveles de expresión del transgén pueden monitorizarse para determinar la frecuencia de la dosificación que da como resultado en vectores virales, preferiblemente vectores de AAV que contienen el minigén.

Como se ilustra en los ejemplos para vectores basados en AAV9, la transducción de células aumentó cuando se eliminó enzimáticamente el SA terminal, lo que sugiere que el monosacárido penúltimo al SA observado más comúnmente, la galactosa, media la transducción de AAV9. Esto contrasta con una serie de otros serotipos de AAV para los cuales la captación mediante glicanos con ácidos siálicos terminales (SA), es un modo de entrada común. La captación de vectores basados en AAV9 por SA terminal se confirmó en células deficientes de enzimas involucradas en la biogénesis de glicoproteínas y en estudios de interferencia por lectina. La unión de AAV9 a los glicanos con galactosa terminal se demostró en los ensayos de unión a glicanos. La relevancia de esta vía para la transferencia de genes dirigida a los pulmones se demostró mediante la instalación conjunta del vector AAV9 con neuraminidasa en pulmón de ratones, que dio como resultado la exposición de galactosa terminal en la superficie apical de las células epiteliales de la vía respiratoria conductora y un aumento sustancial de la transducción mediada por vectores de estas células que son la diana relevante para la terapia génica para la fibrosis quística.

A continuación se proporcionan ejemplos de productos terapéuticos y productos inmunogénicos para el suministro por los vectores que contienen AAV de la invención. Estos vectores se pueden utilizar para una variedad de regímenes, tal como se describe en el presente documento. De manera adicional, estos vectores pueden suministrarse en combinación con uno o más vectores distintos o principios activos en un régimen deseado.

Por ejemplo, los transgenes adecuados pueden incluir aquellos dirigidos preferentemente al pulmón, incluyendo, las células epiteliales de la vía respiratoria conductora. Dichos transgenes pueden incluir aquellos útiles para tratar la fibrosis quística, incluyendo, por ejemplo, el gen regulador de conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), incluyendo, por ejemplo, uno o más minigenes CFTR [L. Zhang et al, (18 de agosto de 1998) Proc. Natl. Acad. Sci USA, 95(17): 10158-63]. De forma similar, se pueden usar genes para el tratamiento de otras afecciones pulmonares, que incluyen, por ejemplo, citoquinas antiinflamatorias u otras moléculas, útiles para el tratamiento de la EPOC y otros trastornos pulmonares.

En otro ejemplo, pueden incluirse transgenes útiles para tratar trastornos de la retina y/o el ojo de manera más general para seleccionarse tal como, por ejemplo, la proteína de 65 kDa (RPE65) específica del epitelio pigmentario de la retina (para el tratamiento de la amaurosis congénita de Lebers (LCA), factor derivado del epitelio pigmentario *bPDE* y *AiPL1* (PEDF) (por ejemplo, para el tratamiento de la degeneración macular y la retinopatía diabética), factores antiangiogénicos que incluyen, por ejemplo, anti factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (por ejemplo, para el tratamiento de la degeneración macular húmeda relacionada con la edad (AMD)), así como otros genes asociados con retinitis pigmentaria y LCA y distrofias de conos y bastones.

En otro ejemplo más, pueden seleccionarse transgenes útiles para tratar trastornos de una articulación, por ejemplo, artritis reumatoide. Tales transgenes pueden ser, por ejemplo, agentes bloqueantes del factor de necrosis tumoral (TNF) alfa o interleucina 1 (IL-1) tal como, por ejemplo, anticuerpos monoclonales anti-TNF alfa, receptor soluble de TNF alfa, receptor soluble tipo II de IL-1, un antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra), citoquinas antiinflamatorias (por ejemplo, IL-4, IL-10, IL1). Tales antagonistas pueden ser, por ejemplo, un anticuerpo o un Fab o un fragmento funcional del mismo u otro resto.

Aún otros genes pueden incluir aquellos útiles para el tratamiento de varias afecciones asociadas con el sistema nervioso central, que incluyen, por ejemplo, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer y trastorno de almacenamiento; genes terapéuticos asociados con cardiopatías congénitas (por ejemplo, SERCA2a, angiopoyetina-1 (Ang1) y Ang2), genes asociados con trastornos sistémicos de almacenamiento lisosómico; y trastorno de desgaste muscular (por ejemplo, la distrofina, minidistrofina), entre otras.

Otros productos terapéuticos útiles codificados por el transgén pueden seleccionarse para una indicación deseada. Tales transgenes incluyen hormonas y factores de crecimiento y diferenciación que incluyen, sin limitación, insulina, glucagón, hormona de crecimiento (GH), hormona paratiroidea (PTH), factor de liberación de la hormona del crecimiento (GRF), hormona foliculoestimulante (FSH), hormona luteinizante (LH), gonadotropina coriónica humana (hCG), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), angiopoyetinas, angiostatina, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), eritropoyetina (EPO), factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento de fibroblastos ácido (aFGF), factor de crecimiento epidérmico

- (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factores de crecimiento de insulina I y II (IGF-I e IGF-II), cualquiera de la superfamilia del factor de crecimiento transformante α , incluyendo TGF α , activinas, inhibinas o cualquiera de las proteínas morfogenéticas óseas (BMP) BMP 1-15, cualquiera de la familia de los factores de diferenciación heregluina/neureglina/ARIA/neu (NDF) de los factores de crecimiento, factor de crecimiento nervioso (NGF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neurotrofinas NT-3 y NT-4/5, factor neurotrófico ciliar (CNTF), factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GDNF), neurturina, agrina, cualquiera de la familia de las semaforinas/colapsinas, netrina-1 y netrina-2, factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), efrinas, nogina, erizo sónico y tirosina hidroxilasa.
- 5 Otros productos transgénicos útiles incluyen proteínas que regulan el sistema inmunitario, incluyendo, sin limitación, citoquinas y linfoquinas como la trombopoyetina (TPO), interleucinas (IL) IL-1 a IL-25 (incluyendo, por ejemplo, IL-2, IL-4, IL-12 e IL-18), proteína quimioatrayente de monocitos, factor inhibidor de la leucemia, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, ligando Fas, factores de necrosis tumoral α y β , interferones α , β y γ , factor de células madre, ligando flk-2/flt3. Los productos génicos producidos por el sistema inmunitario también son útiles en la invención. Estos incluyen, sin limitaciones, inmunoglobulinas IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, inmunoglobulinas quiméricas, anticuerpos humanizados, anticuerpos de cadena sencilla, receptores de linfocitos T, receptores de linfocitos T quiméricos, receptores de linfocitos T de cadena sencilla, moléculas MHC de clase I y clase II, así como inmunoglobulinas y moléculas MHC modificadas por ingeniería. Los productos génicos útiles también incluyen proteínas reguladoras del complemento tales como proteínas reguladoras del complemento, proteína de cofactor de membrana (MCP), factor de aceleración de la desintegración (DAF), CR1, CF2 y CD59.
- 10
15
20
- Otros productos génicos útiles incluyen cualquiera de los receptores para las hormonas, factores de crecimiento, citoquinas, linfoquinas, proteínas reguladoras y proteínas del sistema inmunitario. También son de uso los receptores para la regulación del colesterol y/o la modulación de lípidos, que incluyen el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDL), el receptor de lipoproteínas de alta densidad (HDL), el receptor de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y los receptores eliminadores. También son de uso productos génicos tales como miembros de la superfamilia de receptores de hormonas esteroideas que incluyen receptores de glucocorticoides y receptores de estrógenos, receptores de vitamina D y otros receptores nucleares. Además, productos genéticos útiles incluyen factores de transcripción como *jun*, *fos*, *max*, *myb*, *myc*, *myoD*, *myoE*, *myoD* y *miogenina*, proteínas que contienen caja ETS, TFE3, E2F, ATF1, ATF2, ATF3, ATF4, ZF5, NFAT, CREB, HNF-4, C/EBP, SP1, proteínas de unión a caja CCAAT, factor de regulación del interferón (IRF-1), Proteína de tumor de Wilms, proteína de unión a ETS, STAT, proteínas de unión a caja GATA, por ejemplo, GATA-3 y la familia forkhead de proteínas de hélice alada.
- 25
30
- Otros productos genéticos útiles incluyen, carbamoil sintetasa I, ornitina transcarbamilasa, arginosuccinato sintetasa, arginosuccinato liasa, arginasa, fumarilacetatoacetato hidrolasa, fenilalanina hidroxilasa, alfa-1 antitripsina, glucosa-6-fosfatasa, porfobilinógeno desaminasa, cistationina betasintasa, decarboxilasa del cetoácido de cadena ramificada, albúmina, isovaleril-coA deshidrogenasa, propionil CoA carboxilasa, metil malonil CoA mutasa, glutaril CoA deshidrogenasa, insulina, betaglicosidasa, carboxilato de piruvato, fosforilasa hepática, fosforilasa quinasa, glicina descarboxilasa, proteína H, Proteína T, una secuencia del regulador transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) y un producto génico de la distrofina [por ejemplo, una minidistrofina o microdistrofina]. Otros productos génicos útiles incluyen enzimas que pueden ser útiles en la terapia de reemplazo enzimático, que es útil en una variedad de afecciones que son el resultado de una actividad deficiente de la enzima. Por ejemplo, las enzimas que contienen manosa-6-fosfato se pueden utilizar en terapias para enfermedades de almacenamiento lisosómico (por ejemplo, un gen adecuado incluye el que codifica la β -glucuronidasa (GUSB)).
- 35
40
45
- Otros productos génicos útiles incluyen aquellos usados para el tratamiento de la hemofilia, incluyendo la hemofilia B (incluido el Factor IX) y la hemofilia A (incluido el Factor VIII y sus variantes, tales como la cadena ligera y la cadena pesada del heterodímero y el dominio B delecionado); Patente de Estados Unidos N° 6.200.560 y Patente de Estados Unidos N.º 6.221.349). El gen del Factor VIII codifica 2351 aminoácidos y la proteína tiene seis dominios, designados desde el extremo amino al terminal carboxi terminal como A1-A2-B-A3-C1-C2 [Wood et al, (1984) Nature, 312:330; Vehar et al., (1984) Nature 312:337; y Toole et al, (1984) Nature, 342:337]. El factor VIII humano se procesa dentro de la célula para producir un heterodímero que comprende principalmente una cadena pesada que contiene los dominios A1, A2 y B y una cadena ligera que contiene los dominios A3, C1 y C2. Tanto el polipéptido de cadena sencilla como el heterodímero circulan en el plasma como precursores inactivos, hasta que se activan mediante la escisión de la trombina entre los dominios A2 y B, que libera el dominio B y da como resultado una cadena pesada que consiste en los dominios A1 y A2. El dominio B se elimina en la forma procoagulante activada de la proteína. De manera adicional, en la proteína natural, dos cadenas polipeptídicas ("a" y "b"), que flanquean el dominio B, se unen a un catión de calcio divalente.
- 50
55
60
- En algunos aspectos, el minigén comprende los primeros 57 pares de bases de la cadena pesada del Factor VIII que codifica la secuencia señal de 10 aminoácidos, así como la secuencia de poliadenilación de la hormona del crecimiento humano (hGH). En aspectos alternativos, el minigén comprende además los dominios A1 y A2, así como 5 aminoácidos del extremo N del dominio B y/u 85 aminoácidos del extremo C del dominio B, así como los dominios A3, C1 y C2. En otros aspectos más, los ácidos nucleicos que codifican la cadena pesada y ligera del Factor VIII se
- 65

proporcionan en un único minigén separado por 42 ácidos nucleicos que codifican para 14 aminoácidos del dominio B [Patente de EE. UU. N.º 6.200.560].

5 Tal como se usa en el presente documento, una cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad de vector de AAV que produce cantidades suficientes de Factor VIII para disminuir el tiempo que tarda la sangre de un sujeto en coagularse. Generalmente, los hemofílicos graves que tienen menos del 1% de los niveles normales de Factor VIII tienen un tiempo de coagulación de la sangre total de más de 60 minutos en comparación con aproximadamente 10 minutos para los no hemofílicos.

10 La presente divulgación no se limita a ninguna secuencia específica del Factor VIII. Se han aislado y generado muchas formas naturales y recombinantes del Factor VIII. Se pueden encontrar ejemplos de formas de origen natural y recombinantes del Factor VII en las patentes y en la literatura científica, que incluyen, la Patente de Estados Unidos N.º 5.563.045, la Patente de Estados Unidos N.º 5.451.521, la Patente de Estados Unidos N.º 5.422.260, la Patente de Estados Unidos N.º 5.004.803, la Patente de Estados Unidos N.º 4.757.006, la Patente de Estados Unidos N.º 5.661.008, la Patente de Estados Unidos N.º 5.789.203, la Patente de Estados Unidos N.º 5.681.746, la Patente de Estados Unidos N.º 5.595.886, la Patente de Estados Unidos N.º 5.045.455, la Patente de Estados Unidos N.º 5.668.108, la Patente de Estados Unidos N.º 5.633.150, la Patente de Estados Unidos N.º 5.693.499, la Patente de Estados Unidos N.º 5.587.310, la Patente de Estados Unidos N.º 5.171.844, la Patente de Estados Unidos N.º 5.149.637, la Patente de Estados Unidos N.º 5.112.950, la Patente de Estados Unidos N.º 4.886.876; la Publicación de Patentes Internacionales números WO 94/11503, WO 87/07144, WO 92/16557, WO 91/09122, WO 97/03195, WO 96/21035 y WO 91/07490; la Solicitud de Patentes Europeas números EP 0 672 138, EP 0 270 618, EP 0 182 448, EP 0 162 067, EP 0 786 474, EP 0 533 862, EP 0 506 757, EP 0 874 057, EP 0 795 021, EP 0 670 332, EP 0 500 734, EP 0 232 112 y EP 0 160 457; Sanberg et al., (1992) XXth Int. Congress of the World Fed. Of Hemophilia and Lind et al., (1995) Eur. J. Biochem., 232:19.

25 Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican el Factor VIII descrito anteriormente se pueden obtener usando métodos recombinantes o derivando la secuencia de un vector que se sabe que incluye las mismas. Adicionalmente, la secuencia deseada puede aislarse directamente de las células y tejidos que las contienen, utilizando técnicas convencionales, tales como la extracción con fenol y la PCR de ADNc o ADN genómico [Véase, por ejemplo, Sambrook et al]. Las secuencias de nucleótidos también pueden producirse sintéticamente, en lugar de clonarse. La secuencia completa se puede ensamblar a partir de oligonucleótidos solapantes preparados por métodos convencionales y ensamblados en una secuencia codificante completa [Véase, por ejemplo, Edge, (1981) Nature 292:757; Nambari et al, (1984) Science, 223:1299; y Jay et al, (1984) J. Biol. Chem. 259:6311.

35 Adicionalmente, la divulgación no se limita al Factor VIII humano. De hecho, se pretende que el Factor VIII de animales que no sean seres humanos, incluidos, pero sin limitación, animales de compañía (por ejemplo, caninos, felinos y equinos), ganado (por ejemplo, bovinos, caprinos y ovinos), animales de laboratorio, mamíferos marinos, gatos felinos, etc., sea de uso potencial en la invención.

40 Los vectores de AAV pueden contener un ácido nucleico que codifica fragmentos del Factor VIII que no es biológicamente activo por sí mismo, pero cuando se administra en el sujeto mejora o restaura el tiempo de coagulación de la sangre. Por ejemplo, tal como se ha analizado anteriormente, la proteína del factor VIII comprende dos cadenas polipeptídicas: una cadena pesada y una cadena ligera separadas por un dominio B que se escinde durante el procesamiento. Como se demuestra por la presente divulgación, la transducción conjunta de células receptoras con las cadenas pesada y ligera del Factor VIII produce la expresión del Factor VIII biológicamente activo. Debido a que la mayoría de los hemofílicos contienen una mutación o delección en solo una de las cadenas (por ejemplo, cadena pesadas o ligera), puede ser posible administrar solo la cadena defectuosa en el paciente para suministrar la otra cadena.

50 Otros productos génicos útiles incluyen polipéptidos de origen no natural, tales como polipéptidos quiméricos o híbridos que tienen una secuencia de aminoácidos no natural que contiene inserciones, delecciones o sustituciones de aminoácidos. Por ejemplo, Las inmunoglobulinas modificadas por ingeniería de cadena sencilla podrían ser útiles en ciertos pacientes inmunocomprometidos. Otros tipos de secuencias de genes no naturales incluyen moléculas antisentido y ácidos nucleicos catalíticos, tal como las ribozimas, que podrían usarse para reducir la sobreexpresión de una diana.

60 La reducción y/o modulación de la expresión de un gen es particularmente deseable para el tratamiento de afecciones hiperproliferativas caracterizadas por células hiperproliferativas, como son los cánceres y la psoriasis. Los polipéptidos diana incluyen aquellos polipéptidos que se producen exclusivamente o en niveles más altos en células hiperproliferativas en comparación con las células normales. Los antígenos diana incluyen polipéptidos codificados por oncogenes tales como myb, myc, fyn y el gen de translocación bcr/abl, ras, src, P53, neu, trk y EGRF. Además de los productos oncogénicos como antígenos diana, los polipéptidos diana para tratamientos anticancerosos y regímenes protectores incluyen regiones variables de anticuerpos producidos por linfomas de linfocitos B y regiones variables de receptores de linfocitos T de linfomas de linfocitos T que, en algunas realizaciones, también se usan como antígenos diana para enfermedades autoinmunitarias. Otros polipéptidos asociados a tumores pueden usarse como

polipéptidos diana tales como polipéptidos que se encuentran a niveles más altos en células tumorales, incluido el polipéptido reconocido por el anticuerpo monoclonal 17-1A y polipéptidos de unión a folato.

Otros polipéptidos y proteínas terapéuticos adecuados incluyen aquellos que pueden ser útiles para tratar individuos que padecen enfermedades y trastornos autoinmunitarios al conferir una respuesta inmunitaria protectora de base amplia contra diana que están asociadas con la autoinmunidad, incluyendo receptores celulares y células que producen anticuerpos dirigidos a sí mismos. Las enfermedades autoinmunitarias mediadas por linfocitos T incluyen Artritis reumatoide (AR), esclerosis múltiple (EM), síndrome de Sjögren, sarcoidosis, diabetes mellitus dependiente de insulina (IDDM), tiroiditis autoinmunitaria, artritis reactiva, espondilitis anquilosante, esclerodermia, polimiositis, dermatomiositis, psoriasis, vasculitis, granulomatosis de Wegener, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa. Cada una de estas enfermedades se caracteriza por receptores de linfocitos T (TCR) que se unen a antígenos endógenos e inician la cascada inflamatoria asociada con enfermedades autoinmunitarias.

Los expertos en la materia conocen aún otros productos para el suministro a células diana.

IN. METODO DE AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN

La presente invención se refiere, en un aspecto, a un método para el aislamiento y la detección de AAV9 mediante el uso de β -galactosa unida a un soporte sólido. Dicho método también se puede aplicar fácilmente a la purificación de otro AAV de clado F que tenga sitios de unión para β -galactosa o a las llamadas "cápsides de AAV9 vacías" (proteínas de la cápside intactas sin secuencias genómicas empaquetadas en la misma) que contienen sitios de unión para β -galactosa. Por ejemplo, se entenderá que los vectores de AAV que contienen cápside de AAV quimérica, por ejemplo, aquellos que contienen porciones de AAV9 u otra proteína de la cápside del clado F que tienen sitios de unión a β -galactosa, pueden detectarse, separarse y aislarse de acuerdo con dicho método. Para mayor comodidad a lo largo de esta memoria descriptiva, estos vectores virales y otras proteínas que tienen sitios de unión específicos para β -galactosa como se describe en el presente documento, se denominan "dianas de purificación". Como se ha indicado previamente, se entenderá que la referencia a AAV9 en esta sección se usa para propósitos abreviados y no excluye otras cápsides de AAV que tienen sitios de unión para β -galactosa.

Usando los métodos descritos en el presente documento, la eliminación de los virus específicamente unidos (o "proteínas de la cápside vacía") mediante elución o incubación con una solución con alto contenido de sal recupera eficazmente el AAV9 de una pureza que es más deseable que la que se logra con la sedimentación con CsCl. Además, esta técnica es rápida, no requiere equipo especial y se puede ampliar fácilmente. La invención permite además la provisión de kits útiles para el aislamiento y la detección de cápsides de AAV9 (ya sea una partícula viral empaquetada o "vacía") usando los métodos descritos en el presente documento, que utilizan una columna de afinidad de un solo paso para la purificación y detección de vectores virales y, opcionalmente, un sistema de marcador visualmente detectable.

En un ejemplo, el método proporciona un método para aislar una diana de purificación. Este método implica exponer una muestra que comprende la diana de purificación a una molécula que comprende β -galactosa que se ha unido a un soporte sólido, por lo que la diana de purificación que tiene un sitio de unión para β -galactosa se une selectivamente por la molécula. Posteriormente, el soporte sólido se lava para eliminar el material de la muestra que no está específicamente unido al soporte sólido. La diana de purificación puede separarse, a continuación, del soporte sólido. Opcionalmente, la diana de purificación separada del soporte sólido se concentra para su uso posterior. En un ejemplo, el soporte sólido se carga en una columna de cromatografía por afinidad.

La invención es adecuada para la separación y el aislamiento de vectores virales que tienen cápsides de un AAV de clado F o un AAV que tiene un dominio de unión a células de AAV9. Estos AAV se pueden separar de los materiales encontrados en los cultivos en los que estos virus se producen por la capacidad de sus cápsides para unirse específicamente a β -galactosa. El método de la invención es útil en un proceso para la separación y el aislamiento de un AAV de clado F o un AAV que tiene un dominio de unión a células de AAV9 a partir de cultivos de producción dependientes de auxiliares, tal como adenovirus, AAV1 y los otros materiales virales o celulares encontrados en tales cultivos que no se unen específicamente a β -galactosa.

Para su uso en la presente invención, una o más moléculas de β -galactosa pueden unirse directa o indirectamente (por ejemplo, a través de un enlazador adecuado) a un soporte sólido, como se define en el presente documento. De manera alternativa, la β -galactosa se puede encontrar en una variedad de moléculas, incluidas proteínas, azúcares y restos químicos, que pueden unirse (directa o indirectamente) a un soporte sólido. Para unir eficazmente el AAV9, otro AAV de clado F o quimérico que contiene un dominio de unión a células de AAV9, tales moléculas contienen (exo) galactosa terminal. Un ejemplo de una molécula que contiene β -galactosa es un glicano que tiene β -galactosa terminal. Dichas moléculas pueden obtenerse de fuentes comerciales o prepararse de acuerdo con una variedad de métodos naturales, sintéticos, recombinantes u otros adecuados.

La síntesis química de β -galactosa se conoce en la técnica, tal como la protección TBOC o FMOC de grupos alfaamino. (Véase, Coligan, et al., Current Protocols in Immunology, Wiley Interscience, 1991, Unidad 9). De manera alternativa, los péptidos también pueden sintetizarse mediante los métodos de síntesis de péptidos en fase sólida bien conocidos

(Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149 (1962); Stewart y Young, Solid Phase Peptide Synthesis (Freeman, San Francisco, 1969) pp. 27-62). De manera alternativa, puede utilizarse una molécula química que contenga uno o más restos de β -galactosa, de manera que la molécula química esté unida a un soporte sólido. En otra alternativa más, un soporte sólido para su uso en purificación puede modificarse químicamente o de otro modo para que contenga uno y preferentemente más de un, resto de β -galactosa. Tales restos de β -galactosa pueden unirse directamente al soporte sólido, por ejemplo, mediante un enlace covalente u otro enlace adecuado que soporte la unión de la β -galactosa a la diana de purificación y la eliminación de materiales no específicamente unidos. De manera alternativa, los restos de β -galactosa pueden estar unidos indirectamente al soporte sólido, por ejemplo, mediante un resto que facilita la unión de la β -galactosa al soporte. Dicho un resto puede ser una proteína, un resto químico u otro enlazador adecuado. Los métodos adecuados para unir un resto que contiene β -galactosa o β -galactosa terminal, son conocidos en la técnica y también están disponibles en los fabricantes de soportes sólidos.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "soporte sólido" se refiere a cualquier sustancia, incluidos geles, resinas, perlas, polvos y otros sólidos, a la que se puede unir la β -galactosa o una molécula que contiene una(s) β -galactosa terminal(es) para que la molécula de la β -galactosa unida al soporte sólido resista la unión de la β -galactosa a la diana de purificación y la eliminación de materiales no específicamente unidos. Ejemplos de soportes sólidos adecuados incluyen resinas compuestas de sefarosa, agarosa, agarosa reticulada, mezcla de agarosa poliacrilamida o poliacrilina; perlas (incluidas las microperlas); silicona; vidrio; microceldas; microcápsulas; placas de microtitulación; y biochips. Los soportes útiles incluyen aquellos descritos en la Publicación de Patente Internacional WO 99/27351, publicada el 3 de junio de 1999; la Publicación de Patente Internacional WO 99/27140, publicada el 3 de junio de 1999; la Patente de Estados Unidos N.º 6.096.273; la Publicación de Patente Internacional WO 00/14197, publicada el 16 de marzo de 2000, entre otras.

Se conoce una variedad de microperlas, que incluyen las perlas de aminodextrano descritas en las Patentes de EE. UU. Números 6.074.884; 5.945.293; y 5.658.741. También se pueden emplear dispersiones coloidales de ferrita magnética monodispersas recubiertas con aminodextrano [Patente de Estados Unidos N.º 5.240.640]; partículas de metal [Patente de Estados Unidos N.º 5.248.772]; poliestireno [Patente de Estados Unidos N.º 5.466.609; Patente de Estados Unidos N.º 5.707.877; Patente de Estados Unidos N.º 5.639.620; Patente de EE. UU. N.º 5.776.706] y poliestireno-metal [Patente de EE. UU. N.º 5.552.086; Patente de EE. UU. N.º 5.527.713] como soportes sólidos en métodos de acuerdo con la presente divulgación. Otro tipo de soporte sólido puede contener el sustrato descrito anteriormente recubierto con una capa de sólido metálico de tamaño coloidal cubriendo el recubrimiento de aminodextrano. Se han descrito perlas de poliestireno-aminodextrano recubiertas con coloide de oro/plata, su preparación, caracterización y su uso en análisis de subpoblaciones de glóbulos blancos en sangre total. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N.º 5.248.772; la Patente de Estados Unidos n.º 5.552.086; la Patente de Estados Unidos n.º 5.945.293; O. Siiman and A. Burshteyn, J. Phys. Chem., 104:9795-9810 (2000); y O. Siiman et al, Cytometry, 41:298-307 (2000). Una alternativa a este sustrato recubierto emplea partículas de poliestireno funcionalizadas con carboxi tal como el sustrato del núcleo, recubierto con aminodextrano por acoplamiento con EDAC como se describe en la Patente de EE. UU. N.º 5.639.620. Estos y otros soportes sólidos son conocidos por los expertos en la materia y están disponibles en una variedad de fuentes comerciales, incluyendo, sin limitación, Amersham Pharmacia (Uppsula, Suecia); Pierce; Biorad (Richmond, VA) y Beckman Coulter, entre otras.

En un aspecto el soporte sólido está compuesto de sefarosa activada. La sefarosa activada con CNBr se puede comprar en Amersham Pharmacia. Sin embargo, se conocen otras fuentes de sefarosa y sefarosa activada, como son los métodos de activación y los compuestos de activación. Ejemplos de sefarosa activada adecuada incluyen sefarosa activada con CNBr, carbonildiimidazol, glutaraldehído, hidroxisuccinimida y cloruro de tosilo.

Los métodos para unir la β -galactosa o la molécula que comprende β -galactosa, al soporte sólido se pueden seleccionar entre los métodos conocidos. Tales métodos también se proporcionan por los fabricantes de los soportes sólidos. En un aspecto, el soporte sólido unido a β -galactosa se carga en una columna de afinidad para la separación, el aislamiento y/o la purificación de la diana. En este aspecto, se deja fluir a través de la columna una muestra que contiene la diana de purificación (por ejemplo, lisado de un cultivo de producción de AAV), de modo que la diana de purificación se une específicamente al soporte sólido unido a β -galactosa. Posteriormente, la columna se lava para eliminar el material no específicamente unido, mientras que se conserva la diana de purificación específicamente unida. De manera deseable, el reactivo de lavado es solución salina, u otro reactivo adecuado, que está tamponado a pH fisiológico (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato). La columna se somete, a continuación, a una etapa de lavado adicional en condiciones que eliminan la diana de purificación. De manera adecuada, El reactivo de elución es una solución que contiene altas concentraciones de sal. Un ejemplo adecuado, es una solución salina tamponada con fosfato que contiene NaCl en concentraciones de al menos aproximadamente 0,1M. Otra solución adecuada contiene solución salina tamponada con fosfato y al menos NaCl a aproximadamente 0,4 M. Dada esta información, un experto en la materia puede seleccionar fácilmente una solución salina alternativa que logre un efecto similar. De manera alternativa, el reactivo de elución puede ser cualquier reactivo ácido adecuado o una sal del mismo, (por ejemplo, un reactivo que tenga un pH bajo en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 5). Los ejemplos de dichos reactivos incluyen ácido acético (por ejemplo, 1 mM) y sales del mismo, tales como acetato de sodio y glicina 0,1 M (pH 3), entre otros, que serán fácilmente evidentes para los expertos en la materia. Tras la elución de la diana de purificación (por ejemplo, que tiene un dominio de unión a células de AAV9), el AAV puede estar sujeto a concentración mediante técnicas convencionales.

En otro ejemplo, el soporte sólido unido a β -galactosa se puede incubar con una muestra que contenga la diana de purificación. En tal aspecto, la muestra puede ser una solución que contiene el lisado de un cultivo celular en el que se produjo la proteína a aislar. De manera alternativa, la muestra puede ser una muestra biológica de un sujeto o una muestra biológica de un sujeto en mezcla con un diluyente adecuado. Las "muestras biológicas de un sujeto" incluyen cualquier muestra que incluya, entre otros fluidos, sangre total, plasma o suero, donde los cuerpos formes son células, particularmente células sanguíneas. Dichas muestras pueden purificarse por métodos convencionales, tal como la separación por centrifugación, etc., etc., para el manejo de otras muestras de ese tipo. Estas "muestras biológicas de un sujeto" pueden mezclarse con compuestos de marcaje y/o mezclarse con tampones o diluyentes opcionales para ajustar la concentración de la muestra o preparar la muestra para su análisis. En otra alternativa más, la muestra biológica puede ser una muestra de tejido y el soporte sólido unido a β -galactosa puede mezclarse con un tampón u otro diluyente adecuado para la incubación con la muestra de tejido.

En otro ejemplo, la invención proporciona un kit útil para separar la diana de purificación. Este kit está particularmente bien adaptado para su uso en la producción de vectores virales (por ejemplo, un vector de clado F o de AAV que contiene un dominio de unión a células de AAV9 en su cápside).

Generalmente, dicho kit contiene un soporte sólido que tiene β -galactosa o una molécula que contiene β -galactosa unida a la misma. Dichos soportes sólidos pueden seleccionarse entre los descritos anteriormente. En un ejemplo deseable, el soporte sólido es una perla o gel para incubación con la muestra. En otro ejemplo deseable, el soporte sólido se carga en una columna de afinidad (por ejemplo, una columna de cromatografía líquida) y la muestra se pasa a través de la columna.

Además, dicho kit también puede contener los reactivos deseados, incluidos reactivos de lavado, reactivos de elución y reactivos de concentración. Dichos reactivos pueden seleccionarse fácilmente entre los reactivos descritos en el presente documento y entre reactivos de concentración convencionales. En un ejemplo deseable, el reactivo de lavado es una solución salina isotónica que se ha tamponado a pH fisiológico, tal como la solución salina tamponada con fosfato (PBS); el reactivo de elución es PBS que contiene NaCl 0,4 M y los reactivos y dispositivos de concentración. Por ejemplo, un experto en la materia reconocerá que pueden ser útiles reactivos tales como polietilenglicol (PEG) o NH_4SO_4) o dispositivos tales como dispositivos de filtro. Por ejemplo, un dispositivo de filtro con una membrana de 100 K concentraría AAVr.

Estos kits también pueden contener los reactivos necesarios para mantener o conservar las muestras. De forma más importante, el kit contiene instrucciones para realizar el ensayo competitivo y preparar los controles. También se incluyen en un kit los diluyentes y tampones adecuados para las muestras, los cuadros de indicadores para las comparaciones de señales, los guantes desechables, las instrucciones de descontaminación, las varillas o recipientes del aplicador y las copas de preparación de muestras. Los kits también contienen preferentemente sustancias o medios tampón necesarios, según sea necesario. Un experto en la materia podría reunir cualquier número de kits con la información y los componentes necesarios para realizar el método en un paciente para cualquier receptor y célula diana específicos y comparar los resultados con las normas para ese sitio de unión.

En otro ejemplo más, la divulgación permite la provisión de un kit útil para detectar la presencia de la diana de purificación (por ejemplo, AAV9) en una muestra. Además de contener los componentes descritos anteriormente, dicho kit también puede contener un reactivo marcador que permita la detección visual de la unión de la diana de purificación a la molécula. Este kit está particularmente bien adaptado para la detección de la diana de purificación en una muestra biológica de un sujeto, por ejemplo, la sangre. Este tipo de kit, además de contener el soporte unido a β -galactosa y los reactivos descritos anteriormente, puede incluir además marcadores que sean detectables de manera visual.

El término "marcadores" generalmente se refiere a moléculas, preferentemente moléculas proteicas, pero también a moléculas químicas pequeñas, preferentemente aquellas que son detectables de manera visual. En un ejemplo, estos marcadores permiten la detección emitiendo una señal detectable de una longitud de onda particular al ser excitados por un láser. Las ficobiliproteínas, los colorantes en tándem, ciertas proteínas fluorescentes, las moléculas químicas pequeñas y ciertas moléculas detectables por otros medios pueden considerarse marcadores para estos análisis. Véase, por ejemplo, los marcadores enumerados en Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, 6^a Ed., R.P. Haugland, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR (1996).

Ejemplos de ficobiliproteínas útiles en la presente invención son ficocianina, aloficocianina (APC), aloficocianina B, ficoeritrina (PE) y preferentemente R-ficoeritrina. La PE se encuentra entre los tintes fluorescentes más brillantes disponibles en la actualidad. Conjugada a un anticuerpo, la PE se ha utilizado para detectar interleucina-4 en un ensayo de placa fluorescente y en (MC Custer y MT Lotze, (1990) J. Immunol. Meth., 128, 109-117) y se encontró que era el único fluoróforo probado que producía una señal adecuada. Los colorantes en tándem son moléculas de origen no natural que pueden estar formadas por una ficobiliproteína y otro colorante. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N.º 4.542.104 y la Patente de Estados Unidos N.º 5.272.257. Ejemplos de colorantes en tándem útiles en la presente invención son la ficoeritrocianina o PC5 (PE-Cy5, ficoeritrina-cianina 5.1; excitación, 486-580 nm, emisión, 660-680 nm) [A.S. Waggoner et al, (1993) Ann. N.Y. Acad. Sci., 677:185-193 y la Patente de Estados Unidos N.º 5.171.846] and ECD (ficoeritrina-rojo texas; excitación, 486-575 nm, emisión, 610-635 nm) [Patente de Estados Unidos N.º 4.542.104 y Patente de Estados Unidos N.º 5.272.257]. Otros colorantes en tándem conocidos son PE-

Cy7, APC-Cy5 y APC-Cy7 [M. Roederer et al, (1996) Cytometry, 24:191-197]. Los colorantes en tándem, PC5 y ECD, se han conjugado con éxito directamente a anticuerpos monoclonales mediante varios métodos que implican la activación con iminotiolano del colorante. Otros marcadores que pueden conjugarse directamente con un ligando y usarse con las ficobiliproteínas o colorantes en tándem en la presente divulgación para agregar números adicionales de marcadores (ligandos marcados) al método incluyen moléculas pequeñas que, por excitación, emiten longitudes de onda de menos de 550 nm. Estas moléculas no se solapan con las emisiones de las ficobiliproteínas. Un ejemplo de dicho marcador es el isotiocianato de fluoresceína (FITC). Otros se enumeran en el Manual citado anteriormente. Aún otros marcadores que pueden emplearse en este método para proporcionar colores adicionales son las proteínas conocidas como proteínas fluorescentes verdes y proteínas fluorescentes azules; también pueden ser útiles marcadores que emiten tras la excitación con luz ultravioleta. Las biliproteínas y los colorantes en tándem están disponibles comercialmente de varias fuentes, incluyendo Coulter International Corporation, Miami, FL, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR y Prozyme, Inc., San Leandro, CA. Los otros marcadores o etiquetas analizados anteriormente pueden obtenerse comercialmente de fuentes conocidas.

Los métodos para utilizar estos marcadores serán fácilmente evidentes para los expertos en la materia y pueden implicar la incubación de la muestra en presencia de un marcador antes de poner en contacto el soporte sólido unido a β -galactosa. De manera alternativa, el marcador puede estar unido al soporte sólido. En otra alternativa más, el marcador puede incubarse en el eluato que contiene la diana de purificación después de la etapa de lavado que elimina la diana de purificación específicamente unida del soporte sólido. La selección del marcador y el sistema de detección no son una limitación de la presente invención. Los kits habilitados por la presente invención son útiles para realizar los métodos descritos en el presente documento.

Los siguientes ejemplos son ilustrativos para el alcance de la invención.

IV. EJEMPLOS

Ejemplo 1 - Ensayos de unión y transducción celular.

A. Ensayos de unión

Para los ensayos de unión, las células se rasparon de matraces de 150 cm² y se sembraron en placas de 96 pocillos a 5x10⁵ células/pocillo en 100 μ l de medio frío sin suero (SF). Los vectores de AAV se produjeron como se describe anteriormente por Penn Vector (http://www.med.upenn.edu/gtp/-vector_core.shtml) y se agregaron a 5x10⁹ copias del genoma (CG)/pocillo en 100 μ l de medio SF frío y se incubaron a 4 °C durante 1 hr. Las células se lavaron tres veces con medio SF y se resuspendieron en 200 μ l de PBS. El ADN total se extrajo utilizando el Mini kit de ADN QIAamp (QIAGEN). Las CG unidas a las células se cuantificaron mediante PCR en tiempo real. Los cebadores y la sonda utilizados fueron complementarios a la secuencia de poliA de SV40 del genoma del vector. Cebador directo:

AGCAATAGCATCACAAATTTTCAAA [SEQ ID NO: 2]; Cebador inverso:

CCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTT [SEQ ID NO: 3]; sonda TaqMan: 6FAM-AGCATTTTTTTTCACTGCAT - TCTAGTTGTGGTTTGTGC [SEQ ID NO: 4]-TAMRA. Para los ensayos de transducción celular, las células se sembraron a 10⁵ células/pocillo en placas de 96 pocillos de fondo transparente de pared negra durante la noche. Las placas se colocaron a 4 °C durante 15 min y se agregaron 10⁹ CG del vector de AAV que expresaba ffLuc en 100 μ l de medio SF frío y se incubaron durante 1 hora a 4 °C. Las células se lavaron, a continuación, tres veces con medio SF. Se complementaron los medios calientes que contenían suero y se incubaron las células a 37 °C durante 48 horas. La expresión de ffLuc se monitorizó agregando 150 μ g/ml de sustrato de D-luciferina por pocillo y midiendo las unidades relativas de luz/segundo (ULR/s) usando un luminómetro.

B. Ensayos de Transducción Celular

Para los ensayos de transducción celular, las células se rasparon de matraces de 150 cm² y se sembraron a 5x10⁵ células/pocillo en placas de 96 pocillos de fondo transparente de pared negra durante la noche. Las placas se colocaron a 4 °C durante 15 min y se agregaron 10⁹ CG del vector de AAV que expresaba ffLuc en 100 μ l de medio SF frío y se incubaron durante 1 hora a 4 °C. Las células se lavaron, a continuación, tres veces con medio SF. Se complementaron los medios calientes que contenían suero y se incubaron las células a 37 °C durante 48 horas. La expresión de ffLuc se monitorizó agregando 150 μ g/ml de sustrato de D-luciferina por pocillo y midiendo las unidades relativas de luz/segundo (ULR/s) usando un luminómetro.

C. Experimentos In vivo

AAV con o sin 100 mU de NA en 50 μ l de PBS. La NA se administró 1 hora antes o simultáneamente con la instilación del vector. La expresión del gen *nLacZ* en los pulmones se examinó 21 días después de la administración mediante métodos descritos previamente [Bell, et al, Histochem Cell Biol, 124 (6): 2427-35 (2005)]. Las secciones de pulmón se examinaron con un aumento de 100x y 200x. Las células positivas a *LacZ* en las vías respiratorias conductoras se cuantificaron contando las células positivas por campo de visión de aumento 200X. Los ratones se anestesiaron con ketamina/xilazina y se les administró una instilación intranasal de 100 mU de NA en 30 μ l de PBS o PBS solo como control. Los pulmones se recogieron una hora más tarde mediante los métodos descritos previamente (Bell, 2005,

citado anteriormente) y las secciones se fijaron en acetona fría (-20 °C) durante 5 min. Las secciones de pulmón se bloquearon, a continuación, con solución de bloqueo Carbo-free™ (Vector laboratories) y se incubaron con 15 µg/ml de Aglutinina I de *Ricinus Communis* etiquetada con rodamina (RCA I) y 75 µg/ml de Lecitina de *Sambucus Nigra* (SNA) etiquetada con fluoresceína durante 30 min a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron los portaobjetos dos veces en PBS y se montaron en Vectashield con DAPI (Vector laboratories). Las imágenes se tomaron tanto mediante microscopía de campo amplio (200x) como mediante microscopía confocal (microscopio confocal Zeiss LSM 510). Para la tinción con RCA de músculo, corazón, hígado y cerebro, se extrajeron los órganos de los ratones no tratados y las secciones se tiñeron como se indicó anteriormente. Para la tinción del cerebro con CD31, se incubaron 48 portaobjetos con anticuerpo primario anti-CD31 de rata (BD Pharmingen) seguido de anticuerpo secundario anti-rata marcado con fluoresceína (Vector Laboratories) y RCA marcada con rodamina. Para la tinción de pulmón con α -tubulina, los portaobjetos se procesaron como antes, excepto que las secciones se fijaron en paraformaldehído al 4% y se tiñeron con anticuerpo primario anti- α -tubulina de ratón (Sigma) seguido de anticuerpo secundario anti-ratón de caballo marcado con fluoresceína (Vector Laboratories) y RCA marcada con rodamina. Las imágenes se tomaron con un aumento de 400x. La significancia estadística se determinó mediante la prueba t de Student de 2 colas. Los valores de p inferiores a 0,001 se consideraron significativos. Los datos se representan como la media \pm DE.

Ejemplo 2 - Tratamiento con glicosidasa y competencia con lectinas.

Las células Pro-5 se trataron con 50 mU/ml de NA tipo III de *Vibrio cholerae* (Sigma) en 100 µl de medio SF o las células de control con medio solo durante 2 horas a 37 °C. Algunas células se trataron, a continuación, adicionalmente con 60 mU/ml de β - (1,4) -galactosidasa en 50 µl de tampón de reacción (Sigma) o las células de control con tampón de reacción solo durante 3 horas a 37 °C. Las células se lavaron, a continuación, tres veces antes de los estudios de unión y transducción, como se describe anteriormente. Para estudios de competencia con lectinas, las células Pro-5 se trataron primero con NA para eliminar el ácido siálico. Las células se lavaron con medio SF frío y se añadieron lectinas a 50 µg/ml en 100 µl de medio SF o medio solo como control y se incubaron a 4 °C durante 15 min. A continuación, se retiró la solución de lectinas y se añadió una mezcla de vector de AAV (5x10⁹ CG para ensayos de unión y 10⁹ CG para ensayos de transducción) y 50 µg/ml de lectina o vector solo como control y se incubó a 4 °C durante 1 hora. Las células se lavaron y analizaron, a continuación, para determinar la unión o transducción de AAV como se describió anteriormente. Las lectinas utilizadas en este estudio incluyen la lectina de *Erythrina Cristagalli* (ECL), que se une a galactosil (β -1,4) N-acetilglucosamina, Aglutinina I de *Ricinus Communis* (RCA I), que se une a restos de galactosa terminales, Aglutinina de Germen de trigo (WGA), que se une a N-acetilglucosamina y también interactúa a través del ácido siálico, Lecitina Híbrida de *Hippeastrum* (HHL), que se une a (α -1,3) y (α -1,6) manosa, Isolectina B4 de Lecitina I de *Griffonia Simplicifolia* (GSL B4), que se une a α -galactosa y Lectina de *Lotus Tetragonolobus* (LTL), que se une a la fucosa unida a (Vector Laboratories), que se une a fucosa α -unida (Vector Laboratories).

Ejemplo 3 - Selección de la especificidad de unión a glicanos de AAV9

Para los estudios de unión a la micromatriz de glicanos (GMA), se prepararon partículas similares a virus (VLP) de AAV9 utilizando el sistema de expresión de baculovirus Bac-to-Bac/sistema de expresión Sf9 como se describe anteriormente [Mitchell, et al, 2004, PLoS Biol 2(8): E234] y se examinó en una micromatriz de glicanos de alto rendimiento desarrollada por los núcleos D y H del Consortium for Functional Glycomics (CFG; un NIH National Institute of General Medicine Science Initiative). La matriz impresa (Mammalian Printed Array [PA] V4.1, <http://www.functionalglycomics.org/static/consortium/resources/resourcereh14.shtml>) estaba compuesta de 465 glicanos de mamíferos naturales y sintéticos diferentes, incluidos azúcares sialilados con diferentes enlaces y modificaciones que se generaron utilizando un acoplamiento de amina para unir covalentemente glicanos funcionalizados con amina o glicanoconjugados a un portaobjetos de vidrio activado con N-hidroxisuccinimida reactivo con amina. Un portaobjetos impreso, que contiene seis repeticiones por glicano o glicoconjugado, se incubó con VLP de AAV9 a 200 µg/ml, a continuación ADK9, un anticuerpo monoclonal de cápside (proporcionado por Jurgen Kleinschmidt, German Cancer Research Centre, Heidelberg, Alemania) se solapó a las cápsides unidas, seguido de un anticuerpo secundario marcado con FITC (a 5 µg/ml) para la detección. La intensidad de la fluorescencia se detectó utilizando un escáner confocal ScanArray 5000 (Perkin Elmer Inc.). El software de análisis de imágenes IMAGENE (BioDiscovery, El Segundo, CA) se utilizó para analizar la imagen. La unión relativa para cada glicano se expresó como unidades de fluorescencia relativa media (UFR) de cuatro de las seis repeticiones, calculadas sin utilizar los valores más altos y más bajos. Los datos de unión se analizaron utilizando dos criterios de selección: (I) Glicanos que se encontraban dentro de 3 desviaciones estándar de la media del glicano con el valor más alto de UFR y (II) Glicanos con un coeficiente de variación (% de CV) de <20% entre las UFR de las cuatro repeticiones utilizadas para calcular el valor promedio de UFR (con% de CV = coeficiente de variación, definido como la relación entre la desviación estándar de los datos y la media expresada como porcentaje). La información relevante para la generación de los datos de la matriz de glicanos está disponible en el sitio web de acceso abierto en el siguiente sitio de acceso/URL: http://www.functionalglycomics.org/glycomics/HServlet?operation=view&sideMenu=no&p_sld=primscreen_3528. En este conjunto de datos se incluyen los datos sin procesar, los datos normalizados, la anotación de la muestra, el diseño experimental, la anotación de la matriz de glicanos y los protocolos experimentales (id de acceso primscreen_3528).

Resultados

Tal como se describe en el presente documento, varios AAV descritos anteriormente (serotipos 1, 2, 5 y 6) y los nuevos serotipos de AAV 7, 8, 9 y rh32.33 se examinaron para determinar su unión a la línea de células CHO Pro-5, que se utiliza para estudiar la genética y la bioquímica de la glicosilación, con y sin tratamiento con exo- β -sialidasa (neuraminidasa, NA). Los resultados con la primera generación de AAV fueron los esperados, ya que el pretratamiento con NA (Fig. 1A) no tuvo efecto en la unión de AAV2 y la unión de AAV 1, AAV5 y AAV6 se redujo en al menos dos log (Fig. 1B). Los estudios con los nuevos AAV no mostraron un efecto del tratamiento de NA sobre la unión de AAV7, 8 y rh32.33, mientras que el AAV9 mostró un aumento inesperado de 2,5 log en la unión (Fig. 1B).

Los inventores especularon que la presencia de AS terminal en un oligosacárido inhibía la unión a AAV9 o que la eliminación de AS exponía una molécula que aumentaba la unión. Se consideró que el candidato más probable sería la β -1,3 o la β -14 galactosa, que es el penúltimo monosacárido en la mayoría de los glicanos ricos en AS (Fig. 1A). Estas hipótesis se exploraron inicialmente utilizando mutantes de células somáticas de la línea celular CHO precursora, Pro-5, que son deficientes en varias enzimas relacionadas con la glicosilación en virtud de la resistencia a la lectina [SK Patnaik y P. Stanley (2006) *Methods Enzymol* 416: 159-182]. Lec-2 es deficiente en el transportador de golgi CMP-SA y debe tener un complemento completo de N y O-glicanos que carecen de AS terminal (Fig. 1A). Lec-8 es deficiente en el transportador de golgi de UDP-Gal que debería producir N- y O-glicanos a los que les falta tanto AS como sacáridos de galactosa (Fig. 1A). Los vectores basados en los AAV 2, 6 y 9 que expresan luciferasa de luciérnaga (ffLuc) se incubaron con células Pro-5, Lec-2 y Lec-8 y se analizaron para determinar su unión y transducción (Fig. 2A, B). La unión y transducción de AAV2 fue la misma en las tres líneas celulares y disminuyó con AAV6 en las células Lec-2 y Lec-8 en relación con las células Pro-5, lo cual se espera en base a estudios previos que demuestran la importancia del AS para facilitar la entrada de AAV6. En el caso de AAV9, la unión y la transducción aumentaron sustancialmente en Lec-2, pero disminuyeron hasta los niveles basales en las células Lec-8, lo que es más consistente con la hipótesis de que la unión a β -galactosa terminal facilita la captación en lugar de que el AS inhibe la captación. La coincidencia de la unión con la transducción sugiere que la unión a galactosa terminal es la etapa limitante en la transducción de AAV9. El impacto de eliminar el ácido siálico fue mayor en la unión que en la transducción lo que sugiere que las etapas posteriores a la entrada también pueden limitar la transducción.

El papel de la galactosa terminal en la unión a AAV9 se estudió adicionalmente en células Pro-5 que se trataron previamente con NA y a continuación, se cultivaron conjuntamente con lectinas de diferentes especificidades (Fig. 2C, unión; Fig. 2D, transducción). Las únicas lectinas que bloquearon la unión de AAV9 fueron la Lectina de *Erythrina Cristagalli* (ECL) que reconoce la β -14 galactosa y la Aglutinina I de *Ricinus Communis* (RCA I) que reconoce varios tipos de enlaces β -galactosa con β -14 galactosa que muestra la mayor afinidad; sin afectar la unión de AAV2. Las Lectinas que reconocen α -galactosa [Isolectina B₄ de Lectina I de *Griffonia Simplicifolia* (GSL B₄)], α -1,3 y α -1,6 manosa [Lectina híbrida de *Hippeastrum* (HHL)] y α -fucosa [Lectina de *Lotus Tetragonolobus* (LTL)] no interfirieron con la unión de AAV2 o AAV9. La aglutinina de germen de trigo (WGA) tuvo un ligero efecto sobre la unión de AAV9, probablemente debido a su interacción con la N-acetilglucosamina que comúnmente se une a la galactosa. La inhibición de la lectina de la transducción de AAV2 y AAV9 confirmó los resultados de la unión, excepto la RCA, que no fue ilustrativa ya que era tóxica para las células.

Se realizó una confirmación final de la especificidad a los glicanos de la captación de AAV9 en células Pro-5 tratadas previamente con NA para escindir el AS terminal o NA y la β -galactosidasa (β -gal) que eliminaría tanto NA como sacáridos de β -galactosa (Fig. 1A). La unión y la transducción con AAV2 no se vieron afectadas por el tratamiento previo enzimático, mientras que NA potenció la transducción de AAV9 como se describe anteriormente, un efecto que se revirtió con el tratamiento posterior con β -gal (Fig. 2E, F).

Las interacciones glicano-cápside de AAV9 se examinaron adicionalmente utilizando una micromatriz de glicanos compuesta por 465 glicanos de mamíferos naturales y sintéticos diferentes que contiene 6 repeticiones para cada glicano. Se usó una estrategia similar para verificar la unión de AAV1 a glicanos sialilados según se determinó por enfoques bioquímicos y moleculares (Wu et al., 2006, *J Virol*, 80: 9093-9103). En el análisis de los presentes inventores, cada glicano se evaluó para determinar la unión según lo medido por unidades de fluorescencia relativas (UFR) en términos de la media de cuatro repeticiones dentro de la matriz ± 1 DE (se eliminaron la unión más alta y más baja dentro de las seis repeticiones). La variación dentro de las 4 repeticiones se evaluó como % de CV, que se consideró bajo si era inferior a 20. La selección de glicanos con afinidad de unión específica para las cápsides de AAV9 se basó en dos criterios independientes; la unión total general alta medida por UFR y la baja variación entre las 4 repeticiones según lo evaluado por % de CV. Los glicanos de unión más alta se definieron arbitrariamente como aquellos con valores medios de UFR que se encontraban dentro de 3 DE del glicano 415 de enlace más alto. De los cuatro glicanos que cumplieron con los criterios de alta afinidad de unión, tres mostraron una alta especificidad medida por el % de CV menor de 20. Estos tres glicanos, 415, 297 y 399, demostraron suficiente afinidad y especificidad para ser considerados receptores potenciales para la unión a AAV9. Los tres glicanos seleccionados como específicos para la unión a AAV9 basándose en la unión total y la especificidad de la unión demostraron tener galactosa terminal (Gal) con enlaces β -1,4 (415 y 399) o con un enlace β -1,3 (297). Cada glicano contiene Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc unido β 1-3 o β 1-6 a GalNAc en sus estructuras, lo que sugiere un contexto estructural del glicano deficiente en ácido siálico para unirse a AAV9. La conciliación de los datos de unión con los experimentos de unión/transducción basados en células confirma el papel de los enlaces a β -galactosa terminal en el tropismo de AAV9.

Tal como se describe en el presente documento, se realizaron estudios en ratones para determinar si la transducción de las vías respiratorias conductoras con AAV9 podría potenciarse mediante el tratamiento previo de las vías respiratorias de los ratones con una formulación que contuviera NA. Se realizaron comparaciones con ratones administrados con AAV6 que, en estudios anteriores, mostraron una transducción *in vivo* eficaz de la vía respiratoria conductora, [MP Limberis, et al, (2009) *Mol Ther* 17: 294-301] que basándose en estudios *in vitro* con líneas celulares, puede ser dependiente de la unión a AS [Z. Wu, et al., (2006) *J Virol* 80:9093-9103]. El suministro pulmonar de AAV9 en ausencia de NA demostró el patrón esperado de transducción alveolar restringida; la administración de NA en el pulmón 1 hora antes o en el momento de la administración de AAV9 produjo un patrón muy diferente con transducción de alto nivel tanto en las células epiteliales alveolares como de la vía respiratoria conductora. El alto nivel de transducción de la vía respiratoria conductora obtenido con AAV6 se eliminó completamente cuando los animales se trataron con NA confirmando la dependencia de la transducción *in vivo* de la unión a AS. Las consecuencias del suministro de NA en las vías respiratorias sobre la abundancia y distribución de la estructura del glicano se estudiaron directamente mediante la tinción de secciones de pulmón con lectinas fluorescentes etiquetadas que se unen a los restos terminales de galactosa (RCA) o restos terminales de AS (SNA). Antes del tratamiento con NA, la tinción con RCA se limitaba a las células alveolares y la región lateral basal de las vías respiratorias conductoras. Se observa un patrón similar con SNA aunque también se tiñó la superficie apical de la vía respiratoria conductora. El tratamiento con NA tuvo el resultado más dramático en la tinción de las células epiteliales de la vía respiratoria conductora que aumentaron sustancialmente con respecto a RCA y se redujeron moderadamente respecto a SNA.

Se realizaron estudios microscópicos de mayor resolución para determinar si la unión de RCA se localiza en la membrana plasmática o en la capa mucosa suprayacente. Las secciones de pulmón de animales tratados previamente con NA se evaluaron para la localización conjunta de la tinción de RCA con la inmunolocalización de α -tubulina, que delinea los cilios de la superficie apical de las células epiteliales de las vías respiratorias. Estos estudios demostraron la unión de RCA a la superficie celular de las células epiteliales en la vía respiratoria conductora de los pulmones tratados previamente con NA.

Un impedimento importante para la transducción después de la administración intravascular (IV) de vectores de AAV es la barrera física del endotelio contiguo y la lámina basal de la microcirculación. La única excepción es el hígado que contiene endotelios fenestrados que permite el acceso directo del vector en la sangre a los hepatocitos. El AAV9 es único porque supera parcialmente esta barrera permitiendo el direccionamiento al músculo esquelético y cardíaco y, en menor medida, las células del sistema nervioso central [Inagaki, K., S. et al. (2006), *Mol Ther* 14(1): 45-53.; Duque, et al, (2009) *Mol Ther* 17:1187-1196; K.D. Foust, et al, (2009), *Nat Biotechnol* 27:59-65]. La transducción de *lacZ* se analizó después de la administración IV del vector AAV9 en dosis de 10^{11} y 10^{12} copias del genoma (CG)/ratón. Esto se correlacionó con la presencia de β -galactosa terminal a través de la tinción con RCA. Como se ha descrito, el hígado se transduce de manera eficaz incluso a bajas dosis de vector [Vandendriessche, et al, 2007, *J Thromb Haemost* 5 (1): 16-24]; es posible transducir eficazmente el músculo cardíaco y esquelético a dosis de en un vector superiores [Inagaki, 2006, citado anteriormente]. Las superficies de las fibras musculares de los tejidos esquelético y cardíaco demostraron altos niveles de β -galactosa terminal como se demuestra por unión a RCA. Los hepatocitos demostraron niveles más bajos de unión a RCA aunque las superficies endoteliales de los vasos hepáticos se tiñeron de manera brillante.

Los estudios de unión a lectina de tejidos cerebrales fueron notables por la unión sustancial de RCA pero no de SNA a células endoteliales. Esto es intrigante ya que AAV9 tiene la propiedad única de dirigirse a las células del SNC después de la inyección intravenosa, aunque se logra una transducción eficaz tanto con AAV9 como con AAV5 cuando se inyecta directamente en el cerebro [B.L. Davidson, et al., (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:3428-3432; S.J.]. Un impedimento importante para el suministro de agentes terapéuticos al SNC después de la administración sistémica es la barrera hematoencefálica que se forma a partir de una red excepcionalmente estrecha de células endoteliales. Se han explotado el receptor y las vías de transcitosis mediadas por absorción a través del endotelio para superar esta barrera. Los altos niveles del receptor de AAV9 que se encuentran en la microcirculación del cerebro pueden desempeñar un papel en su capacidad para dirigirse al SNC a través de vías transcitóticas.

El enfoque de este estudio fue el papel potencial de los glicanos en la mediación de la transducción de AAV9 ya que a menudo sirven como receptores para la infección de virus, generalmente con una especificidad exquisita con respecto al componente monosacárido. Se han descrito interacciones específicas con glicanos que contienen ácido siálico terminal para muchos virus incluidos varios serotipos de AAV diferentes. El hallazgo de los presentes inventores de que la unión y la transducción por AAV9 se produce a través de enlaces de β -galactosa terminal no se ha descrito para ningún otro virus, incluidos los AAV conocidos, aunque el Norovirus se une a los glicanos con enlaces α -galactosa [Zakhour, M., (2009)]. El epítipo alfaGal de la familia de antígenos del grupo histosanguíneo es un ligando para el norovirus bovino Newbury2 que se espera que prevenga la transmisión de especies cruzadas. *PLoS Pathog* 5(7): e1000504.).

Los estudios de matrices de glicanos demostraron la unión específica de AAV9 a 3 glicanos, todos los cuales contenían enlaces de β -galactosa terminal que confirman la importancia de este sacárido en la transducción, tal como se describió en múltiples líneas celulares utilizando tres enfoques independientes (es decir, tratamiento previo con glicosidasa, competencia con lectinas y mutantes de células somáticas). Todos estos glicanos contenían Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc unido β 1-3 o β 1-6 a GalNAc en sus estructuras y se unieron a través de treonina a través de un GalNAc indicando que los glicanos que contienen galactosa O-unida son capaces de unirse a AAV9 aunque no se pueden

descartar las interacciones funcionales con glicanos asociados con otros tipos de enlaces (Marth, JD 1999. O-Glycans. Essentials of Glycobiology. A. Varki, R. Cummings, J. Esko et al. Cold Spring Harbor Laboratory Press: p. 101-113.). Una advertencia importante con respecto a los datos de unión es que la afinidad de unión no necesariamente se correlaciona con la importancia funcional en términos de receptores glicosilados que median la transducción. Los receptores para importantes vectores de terapia génica se han caracterizado bien *in vitro*, pero rara vez se ha confirmado la importancia de estos receptores para la transducción *in vivo*. Un ejemplo de una discordancia entre la transducción *in vitro* e *in vivo* es la del adenovirus 5 humano (Ad5). El receptor de adenovirus y virus coxsackie (CAR) se aisló como el receptor para Ad5 basándose en estudios *in vitro* y en intentos de confirmar la importancia de CAR después de la transferencia de genes *in vivo* utilizando Ad5 con unión a CAR eliminada. Después de la administración intravenosa, los niveles de transducción y el perfil selectivo del hígado de los Ad5 con unión a CAR eliminada fueron similares a los de Ad5 lo que sugiere posibles vías de captación redundantes *in vivo*. La investigación del mecanismo de la transducción de Ad5 *in vivo* determinó que la presencia de factores de coagulación de la sangre podría mediar la transducción a través de una vía no dependiente de CAR. En comparación, los estudios de los presentes inventores con vectores AAV9 después de la transferencia génica dirigida al pulmón en combinación con NA proporcionaron confirmación directa de la importancia de los enlaces de β -galactosa en la transducción de las células epiteliales de la vía respiratoria conductora por AAV9.

La evaluación del papel de los enlaces de β -galactosa en la transducción de células de tejidos distintos a los pulmones después de la transferencia de genes *in vivo* es más complicada debido a las barreras de suministro que no están presentes cuando el vector se suministra a las vías respiratorias permitiendo el acceso directo a las células epiteliales. La transducción después de la administración IV de AAV9, que es una vía de administración considerada en muchas aplicaciones clínicas de la terapia génica, ilustra este punto. La infusión IV de vectores basada en la mayoría de los serotipos de AAV da como resultado una transducción limitada principalmente a los hepatocitos debido a que las fenestras de los sinusoides hepáticos eliminan la barrera vascular. En los estudios de los presentes inventores, AAV9 transduce eficientemente los hepatocitos a pesar de los niveles limitados de β -galactosa. Las dosis más altas de AAV9 pueden superar la barrera vascular y transducir eficazmente las fibras musculares cardíacas y esqueléticas que contienen altos niveles de glicanos de β -galactosa en la superficie celular. Como lo señalaron varios grupos, el AAV9 atraviesa de manera única la barrera hematoencefálica aún más fortificada para permitir la transducción limitada de las neuronas. Se especuló que la presencia de glicanos con enlaces de β -galactosa en la superficie de las células endoteliales de alguna estructura vascular, como se ha demostrado en el cerebro, puede estar involucrada en la facilitación de este egreso posiblemente a través de un proceso de transcitosis. La unión demostrada de AAV9 a los glicanos O-unidos de diversas estructuras sugiere que las interacciones con las glicoproteínas no mediadas por células, tal como en la sangre o en las superficies de la mucosa, pueden modular la biodistribución de los vectores y de los perfiles de transducción.

La identificación del receptor primario para AAV9 también fue útil en el desarrollo de un enfoque farmacológico para potenciar su transducción en la vía respiratoria conductora del pulmón. Se espera que se logre el efecto para otras dianas del AAV9, particularmente cuando el vector formulado con NA puede administrarse directamente en el tejido, tal como la retina o en un espacio cerrado tal como una articulación.

Ejemplo 5 - Identificación del Dominio de Unión a Galactosa de la Cápside de AAV9

En este estudio, nuestro objetivo fue identificar los aminoácidos específicos de la cápside de AAV9 necesarios para la unión a galactosa. Mediante mutagénesis dirigida y ensayos de unión celular, más estudios informáticos de acoplamiento de ligandos, se descubrieron cinco aminoácidos necesarios para la unión a galactosa que forman un compartimento en la base de las protuberancias alrededor de los ejes icosaédricos de simetría de orden tres. La importancia de estos aminoácidos también se confirmó mediante estudios *in vivo* en el pulmón de ratones. La identificación de las interacciones necesarias para la unión de AAV9 a galactosa puede conducir a avances en la ingeniería de vectores.

En este estudio, se buscó identificar el motivo de unión a galactosa en la cápside de AAV9. Se generaron una serie de mutantes de alanina para determinar la necesidad de aminoácidos específicos para la unión a galactosa tanto *in vitro* como *in vivo*. Esto condujo al descubrimiento de un compartimento de unión a galactosa en la base de las protuberancias que rodean los ejes de simetría de orden 3 de la cápside de AAV9, lo que también se confirmó mediante estudios de acoplamiento molecular.

A. Materiales y métodos

1. Líneas celulares.

Todas las líneas celulares se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC). Se usaron tres líneas celulares de ovario de hámster chino (CHO) diferentes en los experimentos de unión y transducción, incluida la línea celular parental Pro-5, la línea celular deficiente en ácido siálico Lec-2 y la línea celular deficiente en galactosa Lec-8. Estas células se cultivaron en medio esencial mínimo α (α -MEM) complementado con ribonucleósidos y desoxirribonucleósidos (Invitrogen) con suero bovino fetal (FBS) al 10% y penicilina/estreptomomicina al 1%.

2. Animales.

Se compraron ratones C57BL/6 macho (6-8 semanas de edad) de Charles River Laboratories y se alojaron en la Instalación de animales de los Laboratorios de Investigación Traslacional de la Universidad de Pennsylvania. Todos los procedimientos con animales fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Pennsylvania.

3. Mutagénesis de AAV9 y preparación de vectores a pequeña escala.

Los aminoácidos cargados o polares específicos de la secuencia de la cápside de AAV9 se eligieron para la mutación a alanina no polar, como se indica en las figuras 3A-3B. La mutagénesis se realizó utilizando el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange Lightning de Agilent Technologies. Para la posterior producción a pequeña escala de vectores mutantes para su uso en ensayos de unión y transducción *in vitro*, se realizó una triple transfección de células HEK293 en placas de 6 pocillos (9,6 cm²) utilizando un plásmido que expresa el gen *rep* de AAV2 y el gen *cap* de AAV9 mutante, así como plásmidos que expresan el transgén de ffLuc expresado a partir de un promotor de citomegalovirus (CMV) flanqueado por las repeticiones terminales invertidas de AAV2 y un plásmido auxiliar de adenovirus (pAdΔF6). Las células y el sobrenadante se recogieron después de 72 horas en 2 ml de medio total y se sometieron a tres ciclos de congelación/descongelación y, a continuación, se centrifugaron a 3500 x g durante 30 minutos para eliminar los residuos celulares. Los títulos de los vectores (CG/ml) se determinaron mediante PCR cuantitativa.

4. Producción y purificación de vectores para estudios *in vivo*.

Los vectores de AAV para su uso *in vivo* se produjeron y purificaron mediante Penn Vector como se describe: http://www.med.upenn.edu/gtp/vector_core/production.shtml. Se empaquetó un plásmido que expresaba nLacZ de un promotor de β-actina de pollo y flanqueado por repeticiones terminales invertidas de AAV2 mediante triple transfección de células HEK293 con plásmidos que codifican el gen *rep* de AAV2 y el AAV9 o gen *cap* mutante y un plásmido auxiliar de adenovirus (pAdΔF6). Los vectores se purificaron mediante centrifugación en gradiente de iodixanol y los títulos se determinaron mediante PCR cuantitativa.

5. Ensayos de unión y transducción celular.

Para los ensayos de unión, las células Pro-5, Lec-2 y Lec-8 se rasparon de matraces de 150 cm² y se sembraron a 5x10⁵ células/pocillo en placas de 96 pocillos en 100 μl de α-MEM sin suero frío. Los vectores se agregaron a 5x10⁹ CG/pocillo en 100 μl de α-MEM frío y se incubaron a 4 °C durante una hora. A continuación, las células se lavaron tres veces con 200 μl de α-MEM y se resuspendieron en 200 μl de PBS. El ADN total se extrajo utilizando el Mini Kit ADN QIAamp (QIAGEN) y se determinaron las CG de vectores unidos a células mediante PCR cuantitativa. Para los ensayos de transducción, se sembraron 10⁵ células/pocillo en placas de 96 pocillos de fondo transparente y pared negra durante la noche. Después de la eliminación del medio, el vector de AAV que expresaba ffLuc (10⁹ CG) se añadió a las células en 100 μl de medio completo y se incubó a 37 °C durante 48 horas. La expresión de ffLuc se determinó, a continuación, agregando 150 μg/ml de sustrato de D-luciferina por pocillo en 100 μl de α-MEM y midiendo las unidades de luz relativas/segundo (ULR/s) usando un luminómetro. La eficacia de transducción *in vitro* de los vectores mutantes se muestra en la Fig. 4A y 4B.

6. Transducción de pulmón de ratones.

Como se describe en el ejemplo 3, los ratones se anestesiaron con ketamina/xilazina y se les administró una instilación intranasal de 100 mU de NA en 30 μl de PBS. Una hora más tarde, se suministraron 10¹¹ CG de AAV9 o vector mutante que expresa nLacZ por vía intranasal en 50 μl de PBS. Veintiún días después de la administración, se examinó la expresión de β-gal en los pulmones mediante métodos descritos previamente (Bell, 2005, citado anteriormente). Las secciones de pulmón se examinaron con un aumento de 100x.

7. Predicción del sitio de unión a galactosa en la cápside de AAV9 mediante estudios de acoplamiento molecular.

Se realizó un acoplamiento molecular para predecir el sitio de unión a galactosa en la cápside de AAV9 utilizando el servidor web de acoplamiento molecular PatchDock (<http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PatchDock/index.html>) (Schneidman-Duhovny, et al., Nucleic Acids Res 33 (Web Server issue): W363-7 2005). Se utilizó la estructura cristalina de rayos X para galactosa unida a galectina-3 humana, número de acceso de PDB 1A3K para proporcionar las coordenadas para galactosa (Seetharaman, et al., J Biol Chem, 273 (21): 13047-52 (1998). Las coordenadas para la estructura cristalina de rayos X de AAV9 (datos no publicados) se utilizaron para construir un trímero utilizando el generador de oligómero VIPERdb (http://viperdbscripps.edu/oligomer_multi.php) (Carrillo-Tripp, Nucleic Acids Res, 37 (Database issue): D436-42 (2009). El archivo de salida PDB para el trímero de AAV9 se truncó para incluir aminoácidos que eran accesibles a la superficie y mantenían la integridad estructural de los bucles de superficie de la cápside viral. Los aminoácidos incluidos en el archivo PDB de trímero truncado de AAV9 como el archivo de entrada para el acoplamiento molecular fueron N262 - Y277, L435 - G475 y F501 - M559. El acoplamiento molecular se realizó de forma no dirigida para evaluar el sitio en la cápside de AAV9 que probablemente interactúa con galactosa. El acoplamiento también se

realizó utilizando el trómero de AAV9 truncado y el ácido siálico. Se utilizó la estructura cristalina de rayos X para el virus de rinitis equina A en complejo con su receptor de ácido siálico, número de acceso de PDB 2XBO para proporcionar las coordenadas para el ácido siálico (Fry, et al. J Gen Virol, 91 (Pt8): 1971-7 (2010).

5 B. Resultados

1. N470 es necesario para la unión a galactosa de AAV9

10 Para identificar los aminoácidos potenciales de la cápside de AAV9 que podrían participar en la unión a galactosa, la secuencia de aminoácidos de la cápside de AAV9 se alineó con la de otros serotipos que no se unen a la galactosa, tal como los AAV 1, 2, 6, 7 y 8, para determinar qué aminoácidos son exclusivos de AAV9. Basándose en esta alineación, se eligieron 14 aminoácidos que tienen cadenas laterales polares o cargadas para la mutación a alanina no polar para examinar el efecto sobre la unión de AAV9 (Fig. 3A). Estas construcciones de cápside mutantes se usaron para hacer vectores mediante métodos de preparación a pequeña escala y produjeron títulos similares en comparación con AAV9 de tipo silvestre.

Los vectores mutantes se agregaron, a continuación, a tres líneas celulares CHO diferentes para evaluar sus capacidades de unión. Se utilizaron en estos experimentos la línea celular CHO parental Pro-5, así como los mutantes por glicosilación de células somáticas de esta línea celular, Lec-2 y Lec-8. Las células Lec-2 son deficientes en el transportador de Golgi de monofosfato de citidina-ácido siálico y, por lo tanto, carecen de restos de ácido siálico en sus glicanos de superficie, lo que permite la exposición del penúltimo sacárido más común, la galactosa. Las células Lec-8 son deficientes en el transportador de Golgi de difosfato de uridina-galactosa y, por consiguiente, están desprovistos de sacáridos de galactosa en sus estructuras de glicanos de superficie. Al examinar la unión del vector a estas líneas celulares CHO, se observaron los resultados esperados para AAV9. Se observó un bajo nivel de unión en las células Pro-5, pero se demostró que aumenta 100 veces en las células Lec-2, que tienen restos de galactosa terminales libres para unirse a AAV9. La unión a las células Lec-8 se redujo de nuevo al nivel basal debido a su falta de galactosa en la superficie celular. Trece de los catorce vectores mutantes demostraron esta tendencia de un aumento de la unión en las células Lec-2, lo que sugiere que conservaron la capacidad de unirse a galactosa. Sin embargo, la mutación del resto de asparagina en la posición 470 a alanina (N470A) redujo la unión a las células Lec-2 al nivel observado en las células Pro-5 y Lec-8. Esto indicó que se requiere N470 para la unión de AAV9 a galactosa.

2. Se requieren aminoácidos adicionales ubicados cerca de N470 para la unión a galactosa de AAV9

35 Se generaron mutantes adicionales de AAV9 para determinar si alguno de los aminoácidos que rodean estructuralmente a N470 también están contribuyendo a la unión a galactosa. Este segundo conjunto de mutantes se dirigió a los aminoácidos a lo largo de múltiples regiones variables definidas (VR) de la cápside, incluidas VR I, IV, V y VII, que en la estructura icosaédrica ensamblada del virión entran en estrecho contacto entre sí. Se seleccionaron diecinueve aminoácidos cerca de N470 para la mutación a alanina (Fig. 3B) y se produjeron los vectores mediante métodos a pequeña escala. Como antes, todos los mutantes produjeron un vector de título alto similar al AAV9 control, lo que sugiere que ninguna de las mutaciones tuvo un efecto negativo en el ensamblaje de la cápside. Los vectores mutantes se probaron, a continuación, para determinar su capacidad para unirse a células Pro-5, Lec-2 y Lec-8 (Fig. 3B). De nuevo, AAV9 mostró el resultado esperado de un aumento de 100 veces en la unión a las células Lec-2 en comparación con las células Pro-5 y Lec-8. Si bien la mayoría de los mutantes probados también mostraron este fenotipo, cuatro mutantes demostraron una pérdida de unión a las células Lec-2. La mutación de D271, N272, Y446 o W503 suprimió la capacidad de AAV9 para unirse a galactosa.

45 Junto con estos diecinueve mutantes de alanina, se realizaron otras cuatro mutaciones dirigidas al sitio de AAV9. Los aminoácidos no polares A472 y V473 están ubicados directamente al lado de N470 y podrían desempeñar un papel en la unión a galactosa. Para probar esta idea, A472 y V473 fueron mutados al aminoácido serina polar o al aminoácido ácido aspártico cargado. La construcción de estos vectores por métodos a pequeña escala fue exitosa y los títulos se obtuvieron de forma similar al AAV9 de tipo silvestre. Al examinar la unión de estos vectores a las células CHO, se observó que los cuatro mutantes (A472S, A472D, V473S y V473D) perdieron la capacidad de unirse a las células Lec-2. Esto sugiere que estos restos no polares son esenciales para la formación de la región de unión a galactosa porque la adición de polaridad o carga a esta región interrumpió la interacción con galactosa.

3. La unión a galactosa de mutantes de AAV9 es indicativa de la eficacia de la transducción *in vitro*

50 Para evaluar la transducción de mutantes de AAV9 *in vitro*, se agregaron vectores que expresan luciferasa de luciérnaga (ffLuc) células Pro-5 y Lec-2. Los cinco mutantes que perdieron la unión a galactosa (N470A, D271A, N272A, Y446A y W503A), así como dos mutantes que conservaron la unión a galactosa (S469A y E500A) y un vector de AAV9 control se agregaron a las células (MOI = 104) y evaluaron para la expresión de ffLuc 48 horas después. Como se esperaba, los mutantes que carecen de capacidad de unión a galactosa demostraron una disminución de 3 veces o más en la transducción de células Lec-2 en comparación con AAV9, S469A y E500A. W503A y N272A mostraron los niveles de transducción más bajos, justo por encima del fondo. En las células Pro-5, la transducción general fue de 2 a 5 veces menor porque estas células carecen de abundantes restos de galactosa terminales para la unión. Sin embargo, todavía se observó una tendencia similar en la transducción que la determinada para las células

Lec-2. Los mutantes deficientes en la unión a galactosa mostraron la transducción más baja y los dos mutantes que conservaron la unión a galactosa (S469A y E500A), así como el vector de AAV9 control, demostraron niveles más altos de transducción. E500A, sin embargo, mostró una expresión aproximadamente 2 veces mayor que AAV9 en células Pro-5, lo que sugiere que este vector puede tener interacciones intracelulares favorables.

5

4. Los vectores mutantes deficientes en la unión a galactosa el epitelio de la vía respiratoria conductora

EL suministro de neuraminidasa (NA) por vía intranasal a ratones antes de la administración intranasal del vector AAV9 permite una transducción eficaz de AAV9 del epitelio de la vía respiratoria conductora del pulmón. Esto ocurre porque la NA escinde los restos de ácido siálico terminales de los glicanos de la superficie de las células de las vías respiratorias, lo que expone los restos de galactosa subyacentes y permite la unión y transducción de AAV9. Se estudió si los vectores mutantes que son deficientes en la unión a galactosa pueden transducir el epitelio de la vía respiratoria conductora *in vivo*. Los vectores (10^{11} CG) que expresaban LacZ (nLacZ) con dianas nucleares se suministraron por vía intranasal a ratones una hora después de la instilación de 100 mU NA y, a continuación, veintidós días más tarde, se extrajeron los pulmones y se tiñeron para determinar la expresión de β -gal. El vector de AAV9 control demostró una transducción eficaz de la vía respiratoria conductora, según lo esperado, en base a los resultados anteriores de los presentes inventores. Los cinco mutantes que perdieron la capacidad de unirse a galactosa (N470A, D271A, N272A, Y446A y W503A) no pudieron transducir la conducción el epitelio de la vía respiratoria conductora, lo que demuestra aún más su incapacidad para unirse a galactosa *in vivo*. Los mutantes S469A y E500A, que conservaron la unión a galactosa, mostraron una transducción de la vía aérea conductora eficaz similar a AAV9.

10

15

20

5. Los aminoácidos necesarios para la unión forman un compartimento en la cápside de AAV9 que soporta la interacción con galactosa

Utilizando el conocimiento de la estructura de AAV9, se determinó la ubicación de los aminoácidos importantes para la unión a galactosa en la superficie de la cápside. Se utilizó un enfoque de acoplamiento molecular para identificar los sitios de unión a galactosa en un trímero de VP de AAV9. Se evaluaron los 100 mejores resultados de acoplamiento y se descartaron las soluciones de acoplamiento que colocaron galactosa en la superficie interna de la cápside. La totalidad de las 13 soluciones restantes acoplan galactosa en contacto directo con N470, con 12 de las 13 soluciones que acoplan galactosa entre N470 y W503. N470, D271, N272, Y446 y W503 forman un compartimento en la base de las protuberancias que rodean los ejes de simetría de orden 3. El compartimento está formado por la superficie exterior de las protuberancias que se encuentran frente a los ejes de orden 2 y 5 y una pequeña protuberancia superficial entre los ejes de orden 2 y 5 formada por VR I. AAV9 contiene un compartimento de unión donde se ilustra con más detalle cómo encaja el resto de galactosa en esta región. Los aminoácidos A472 y V473 no polares que se consideran importantes para la unión a galactosa están ubicados en la base del compartimento de unión y, por lo tanto, probablemente permitan la inserción exitosa del sacárido de galactosa. Una característica interesante del sitio de unión a galactosa es que los aminoácidos que se ha demostrado que son importantes para la unión son de dos monómeros diferentes, donde Y446, N470, A472 y V473 forman el fondo del compartimento de unión y los aminoácidos que conforman el techo del compartimento de unión, D271, N272 y W503, son de otro monómero contribuyente. Esto puede proporcionar un mecanismo para garantizar que solo las cápsides bien ensambladas puedan unirse al receptor. De manera significativa, después de la identificación del compartimento de unión a galactosa, un intento de acoplar una molécula de ácido siálico en la misma región de la cápside mostró que este glicano no se puede acomodar en el compartimento debido al impedimento estérico. Esta observación es consistente con la falta de unión de ácido siálico por AAV9.

25

30

35

40

45

C. Análisis

Experimentos previos que estudiaron las interacciones de glicanos en la superficie celular de AAV9 demostraron que este vector utiliza galactosa como receptor celular. El análisis de la unión de AAV9 y la transducción de múltiples líneas celulares, incluidas las células Pro-5, HEK293 y Huh-7, reveló que la eliminación enzimática de los restos terminales de ácido siálico de los glucanos de la superficie celular utilizando NA conducía a un aumento significativo en la unión de AAV9. Este aumento se debió a la exposición de los sacáridos de galactosa subyacentes, lo que facilitó la unión y transducción de AAV9. Otros estudios que utilizaron las líneas celulares CHO mutantes por glicosilación Lec-2 y Lec-8, así como los ensayos de competencia con lectinas, confirmaron este papel de la galactosa. De manera adicional, La NA administrada por vía intranasal a ratones condujo a un aumento en los restos de galactosa terminales en la superficie de las células de las vías respiratorias y, por lo tanto, a un aumento en la transducción de AAV9.

50

55

El objetivo de este estudio era identificar los aminoácidos de la cápside de AAV9 necesarios para la unión a galactosa, los cuales los inventores de la presente invención determinaron que incluyen N470, D271, N272, Y446 y W503. Comparando el sitio de unión a galactosa de AAV9 con el de otras proteínas de unión a galactosa, se descubrieron similitudes con respecto a la composición de aminoácidos. La interacción de los azúcares con restos aromáticos es común en el sitio de unión de las proteínas de unión a carbohidratos y se ha observado las proteínas específicas de galactosa (Elgavish, et al., 1997, Trends Biochem Sci 22(12): 462-7.; Sujatha, et al., 2005, Biochemistry 44(23): 8554-62). Estos restos forman interacciones hidrófobas con el sacárido y también participan en la discriminación de la galactosa de otros azúcares, tal como la glucosa (Elgavish, 1997; Sujatha, 2005). Esto es consistente con el sitio de enlace mapeado para AAV9 de los presentes inventores, que contiene dos restos aromáticos, Y446 y W503. De

60

65

manera adicional, muchas proteínas de unión a galactosa contienen aminoácidos polares y cargados, incluyendo asparagina, ácido aspártico y glutamina, que se ha demostrado que contribuyen a la unión a galactosa formando enlaces de hidrógeno con los grupos hidroxilo del azúcar (Montfort, et al., 1987, J Biol Chem 262(11): 5398-403; Elgavish, 1997). Es probable que N470, D271 y N272 de la cápside de AAV9 estén formando interacciones similares con la galactosa. También se ha determinado la ubicación del dominio de unión al receptor de otros serotipos de AAV. El sitio de unión a HS de AAV2 se mapeó a cinco aminoácidos: R484, R487, R585, R588 y K532 (Kern, 2003 J Virol 77(20): 11072-81.; Opie, 2003, J Virol 77(12): 6995-7006). Estos aminoácidos forman un parche básico en el interior de cada protuberancia de la cápside relacionada con la simetría de orden 3. AAV6, que también se ha demostrado que se une a HS, contiene una extensión básica similar de aminoácidos en posiciones análogas como se observó para AAV2, incluyendo R485, R488, K528 y K533 (Ng, et al., 2010, J Virol 84(24): 12945-57). Además, a través de los estudios de mutagénesis, K493, K459, R576 y K531, se ha demostrado que todos son necesarios para la unión a HS de AAV6 y están ubicados en posiciones vecinas. El dominio de unión a galactosa de AAV9, ubicado en la base de las protuberancias que rodean los ejes de orden 3, se encuentra en el lado opuesto de esta estructura en comparación con la región de unión a HS de AAV2, que se encuentra en la superficie interior frente al eje de orden 3. Los restos de unión a HS de AAV6 también se ubican en la pared exterior de las protuberancias, pero en la pared opuesta más cerca de VR III y del eje icosaédrico de orden 2 comparado con los restos de unión a galactosa de AAV9. Estas observaciones ilustran además la importancia de los aminoácidos y las estructuras que ensamblan las protuberancias que rodean los ejes de orden 3 y los restos adyacentes a esta región en el reconocimiento del receptor para diferentes serotipos de AAV. También respalda la propuesta de que la variabilidad estructural común de las cápsides de AAV, en particular las protuberancias expuestas a la superficie, ha evolucionado para permitir la utilización de diferentes moléculas de superficie para una infección exitosa, lo que es un determinante importante de sus respectivos fenotipos de transducción.

AAV9 muestra características únicas que podrían explicarse potencialmente por las interacciones del receptor. Por ejemplo, después de la inyección intravenosa, el AAV9 puede superar la barrera hematoencefálica y transducir las neuronas motoras en la médula espinal de ratones y gatos adultos y neonatales, así como las neuronas en el cerebro de ratones neonatales y los astrocitos en el cerebro de ratones adultos. Asimismo, cuando se probaron en primates no humanos, AAV9 transdujo las neuronas motoras en la médula espinal y principalmente células gliales en el cerebro. Por tinción con lectina fluorescente, los presentes inventores han observado anteriormente una abundante expresión de galactosa en la superficie de los vasos sanguíneos en el cerebro de ratones. AAV9 posiblemente podría estar usando galactosa para facilitar la transcitosis a través de la vasculatura, permitiendo la entrada en el sistema nervioso central. La modificación por ingeniería del dominio de unión a galactosa en la cápside de otros serotipos de AAV puede permitir la transferencia de fenotipos atractivos de AAV9 y el desarrollo de nuevos vectores para la terapia génica.

EJEMPLO 6 - El tratamiento previo con NA mejora la expresión de ffLuc mediada por AAV en la vía respiratoria nasal de ratones

Se anestesiaron ratones C57BL6 (6-8 semanas de edad, 20-25 g de peso, macho) con una mezcla de ketamina/xilazina. A continuación se administró a los ratones 5 μ l de neuraminidasa (NA) de Vibrio cholera (Sigma, N7885) en cada fosa nasal (un total de 80-100mU de NA). Dentro de los 10 minutos posteriores al tratamiento previo con NA, se instiló el vector AAV9 (10^{11} dosis total de CG) que expresaba luciferasa de luciérnaga (ffLuc) bajo el control transcripcional del promotor de β -actina de pollo como dos alícuotas de 15 μ l diluidas en PBS (15 μ l por narina). Se dejó que los ratones se recuperaran y se monitorizó la expresión del transgén (ffLuc) tan pronto como 24 horas después de la inoculación del vector.

En el momento de la obtención de imágenes por luminiscencia, los ratones se anestesiaron y se les administró luciferina [15 μ l a 15 mg/ml de solución de D-luciferina (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA) por narina en ambas narinas] y se tomaron imágenes para determinar su expresión dentro de los 5 minutos de la aplicación de luciferina. Se dejó que los ratones se recuperaran para los procedimientos de toma de imágenes posteriores en los días 3, 7, 14, 21 y 28.

Estos resultados se ilustran en el gráfico de barras de la Fig. 5. Estos datos muestran una mejora de aproximadamente 2 veces en la expresión del gen de luciferasa de luciérnaga en la vía aérea nasal después del tratamiento previo con neuraminidasa. Esta diferencia se observó en dos ocasiones separadas. Asimismo, la adición de neuraminidasa dio como resultado un rápido inicio de la expresión génica, observándose la expresión génica más alta dentro de las 24 horas posteriores a la instalación del vector AAV9 que disminuyó a niveles de estado estable en una semana.

Aunque la invención se ha descrito con referencia a realizaciones particularmente preferidas, se apreciará que se pueden realizar modificaciones dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> The Trustees of the University of Pennsylvania
Wilson, James M.
Bell, Christie L.
Vandenbergh, Luc H.

ES 2 724 800 T3

<120> Composiciones y Métodos para Alterar la Especificidad de Tejido y Mejorar la Transferencia Génica Mediada por AAV9

<130> UPN-X5836PCT

<150> US 61/443,879

<151> 2011-02-17

<160> 4

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 736

<212> PRT

<213> Desconocido

<220>

<223> cápside de hu.14/AAV9

<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 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

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

ES 2 724 800 T3

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
355 360 365

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

ES 2 724 800 T3

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

- 5 <210> 2
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 10 <220>
<223> Cebador directo basado en homo sapiens
- <400> 2
agcaatagca tcacaaattt cacaa 25
- 15 <210> 3
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 20 <220>
<223> Cebador inverso basado en homo sapiens
- <400> 3
ccagacatga taagatacat tgatgagtt 29
- 25 <210> 4
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 30 <220>
<223> Sonda TaqMan basada en homo sapiens
- 35 <400> 4
agcattttt tcaactgcatt ctagtgtgg tttgtc 36

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un vector viral de virus adenoasociado (AAV) que tiene una cápside de AAV de clado F que comprende un dominio de unión a β -galactosa de la superficie celular para su uso en terapia en combinación con una neuraminidasa que proporciona medios para la escisión enzimática de ácido siálico en un sujeto que tiene células con un glicano de superficie celular que tiene ácido siálico terminal y una penúltima β -galactosa, en donde dicho vector de AAV comprende además un minigén que tiene repeticiones terminales invertidas de AAV y un gen heterólogo unido operativamente a secuencias reguladoras que dirigen su expresión en una célula hospedadora.
2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha neuraminidasa es para su uso como un tratamiento previo del sujeto, antes de la administración de dicho vector viral de AAV o en donde dicho vector viral de AAV y dicha neuraminidasa son para el suministro a dicho sujeto de manera sustancialmente simultánea.
3. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, para el suministro simultáneo, en donde la composición comprende además un transportador para dicho vector viral de AAV y dicha neuraminidasa.
4. La composición para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, que comprende dicho vector de AAV y una composición para modificar un glicano que tiene un resto de ácido siálico terminal y un resto de β -galactosa subterminal, adecuada para instilar en el pulmón.
5. Una composición que comprende una combinación de (a) una neuraminidasa, (b) un vector de virus adenoasociado (AAV) que tiene una cápside de AAV de clado F que tiene un dominio de unión a β -galactosa de la superficie celular, comprendiendo dicho vector además un minigén que tiene repeticiones terminales invertidas de AAV y un gen heterólogo unido operativamente a secuencias reguladoras que dirigen su expresión en una célula hospedadora y (c) un transportador farmacéuticamente aceptable.
6. La composición de acuerdo con la reivindicación 5, en donde dicho clado comprende al menos AAV hu.14/AAV9, hu.31 y hu.32.
7. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o la composición de acuerdo con la reivindicación 5 o la reivindicación 6, en donde el vector de AAV comprende una cápside de AAV9, en donde la cápside de AAV9 es al menos el 95% idéntica a la vp3 de AAV9 que tiene los aminoácidos 203 a 736 de la SEQ ID NO: 1.
8. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, como dependiente de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o la composición de acuerdo con la reivindicación 7, como dependiente de la reivindicación 5 o la reivindicación 6, en donde la neuraminidasa es para el suministro al sujeto antes del suministro del AAV.
9. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o cualquier reivindicación precedente dependiente de las mismas o la composición de acuerdo con la reivindicación 5 o la reivindicación 6 o cualquier reivindicación precedente dependiente de las mismas, en donde la neuraminidasa se selecciona del grupo que consiste en una neuraminidasa bacteriana o una neuraminidasa humana.
10. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la composición de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la cápside de AAV de clado F contiene el Y446, N470, A472, V473, D271, N272 y W503 en la ubicación de aminoácidos correspondiente de AAV9.
11. Un vector AAV9 recombinante modificado para disminuir o eliminar sustancialmente la capacidad natural del AAV9 de tipo silvestre (wt) para transducir la vía respiratoria conductora, teniendo dicho vector una cápside de AAV9 en la que un aminoácido de AAV9 natural seleccionado del grupo que consiste en: las posiciones 271, 446 y 470 basadas en las posiciones de la SEQ ID NO: 1, se reemplaza por una alanina.
12. Un método para aislar un vector viral de virus adenoasociado (AAV) que tiene una cápside de un AAV de clado F que tiene un dominio de unión a β -galactosa de la superficie celular, comprendiendo dicho método: exponer una muestra que comprende el vector viral del virus adenoasociado (AAV) que tiene una cápside de un AAV de clado F para poner en contacto con una molécula que comprende β -galactosa que se ha unido a un soporte sólido, por lo que la diana de purificación que tiene un sitio de unión para β -galactosa se une selectivamente mediante la molécula; lavar el soporte sólido para eliminar el material de la muestra que no está unido específicamente al soporte sólido; y separar el vector viral del soporte sólido.
13. El método de acuerdo con la reivindicación 12, que comprende además la etapa de concentrar el vector viral separado.
14. El método de acuerdo con la reivindicación 12 o la reivindicación 13, en donde el soporte sólido se carga en una columna de cromatografía por afinidad.

Línea celular	Pro-S	Lec-2	Lec-8
Enzima	---	NA	NA, β -gal
N-unido			
O-unido			

◆ Ácido silílico ○ Galactosa ■ N-acetilglucosamina □ N-acetilgalactosamina ▲ Fucosa ● Manosa

FIG. 1A

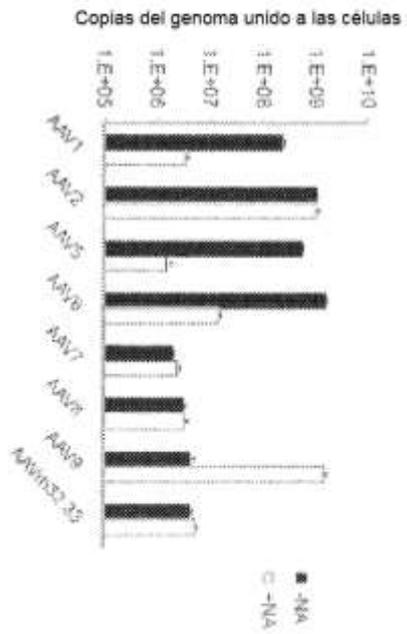


FIG. 1B

Número	Estructura del glicano	UFR promedio	DE a partir de 4 puntos	% de CV	Dibujo del glicano
415	Fucosil-2-Galβ1-4Fucosil-2-3GalNAcβ1-6GalNAc-5a14	653	75	12	
297	Galβ1-3(NeuAcα2-2)Galβ1-4Fucosil-2-3GalNAcβ1-6GalNAc-5a14	690	110	19	
428	GalNAcα1-5Fucosil-2-3Galβ1-3GalNAcβ1-3GalNAc-5a14	519	198	39	
360	Galβ1-4Fucosil-2-3GalNAcβ1-3GalNAc-5a14	492	94	17	
417	GalNAcα1-3Fucosil-2-3Galβ1-4Fucosil-2-3GalNAcβ1-3GalNAc-5a14	297	23	6	

FIG. 1C

FIG. 2A

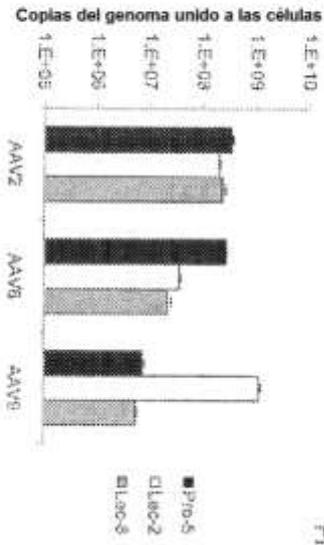


FIG. 2B

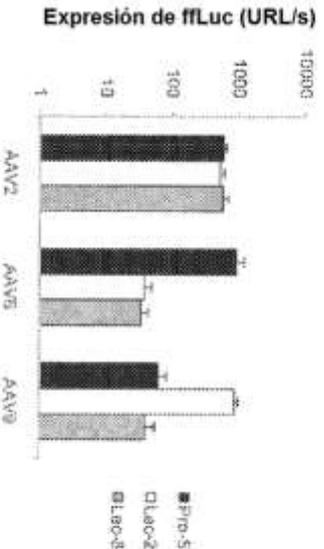


FIG. 2C

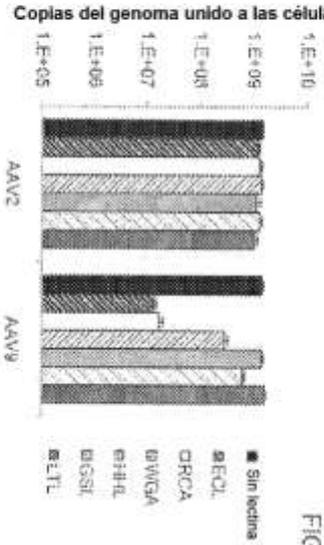


FIG. 2D

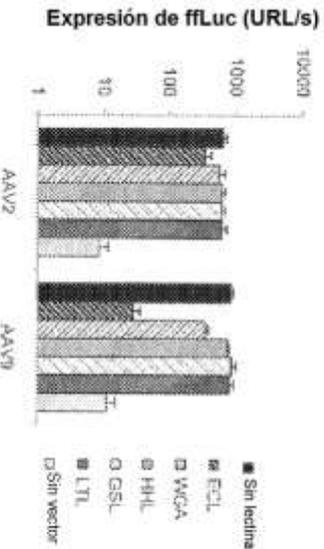


FIG. 2E

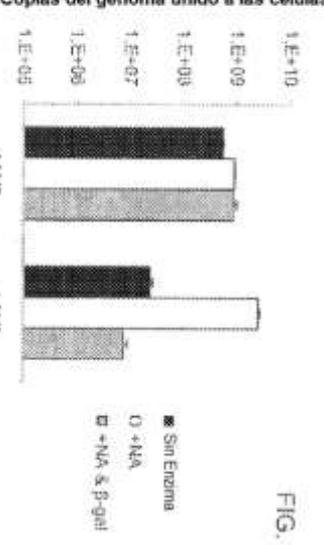
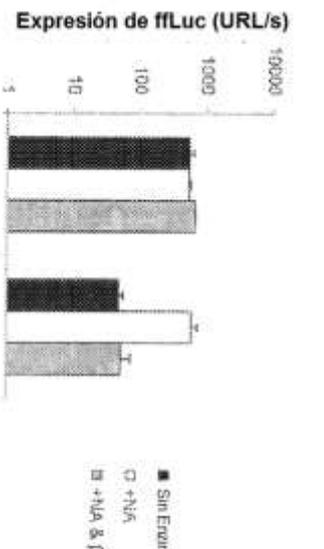


FIG. 2F



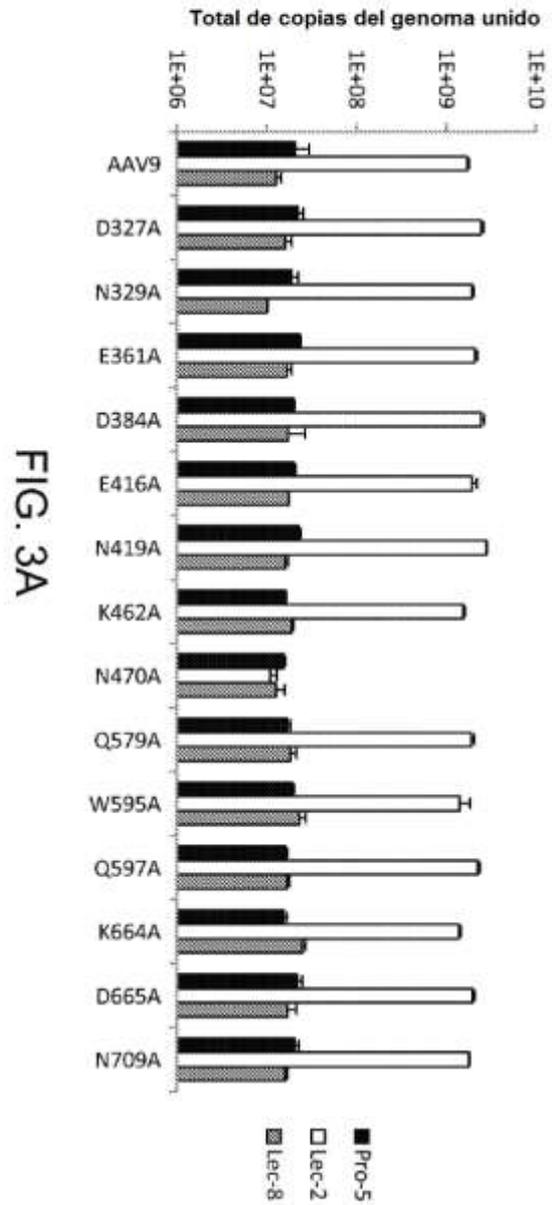
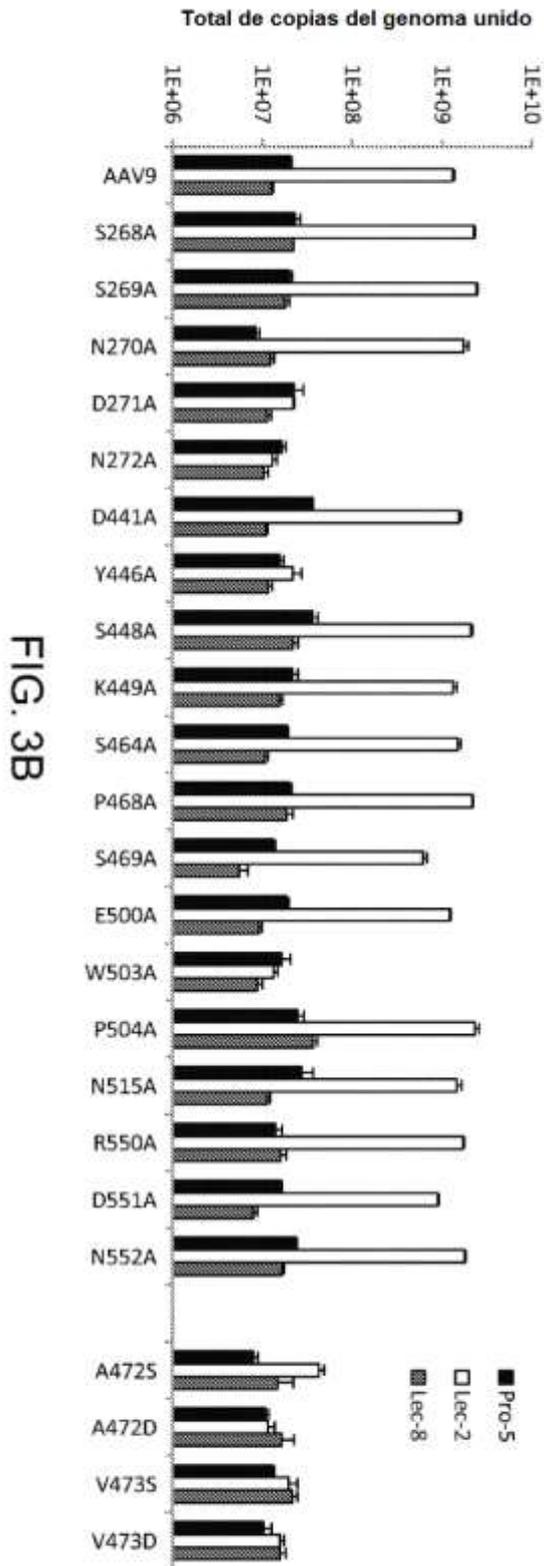


FIG 4A

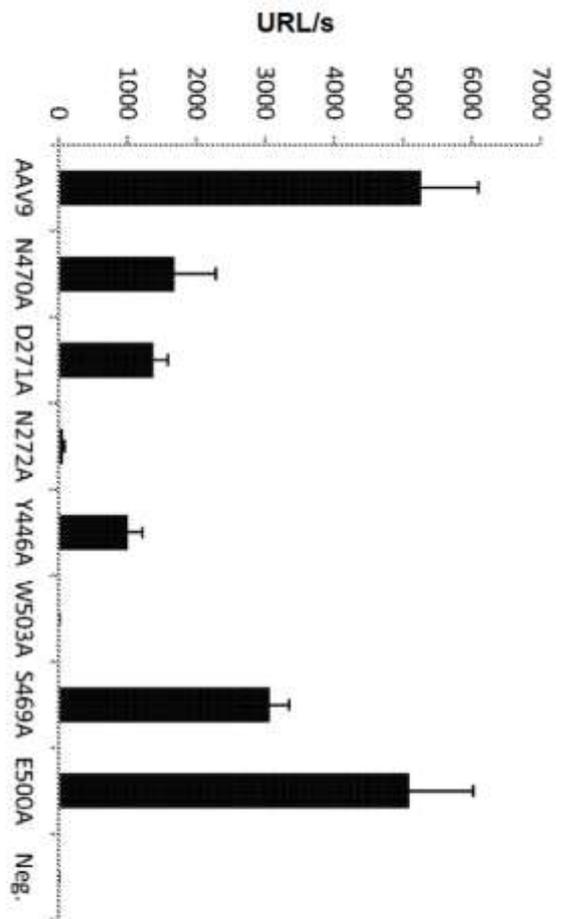
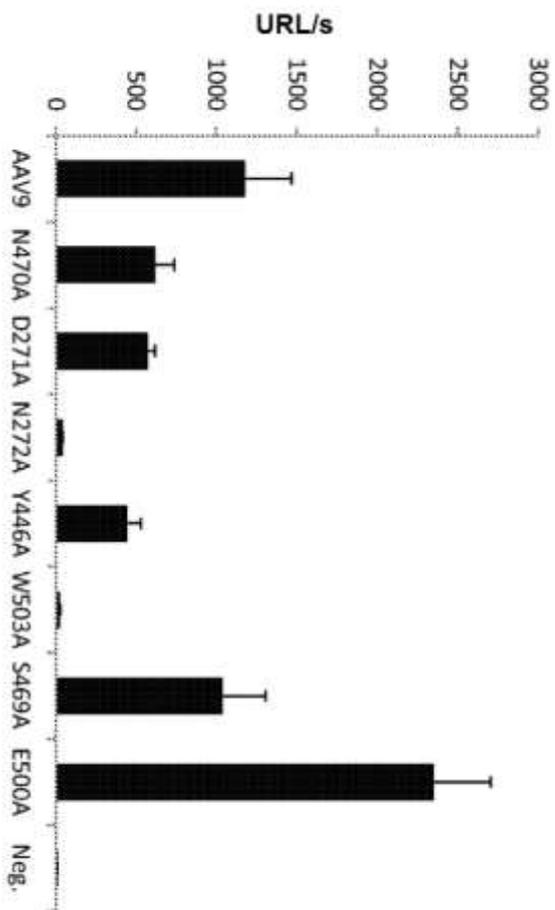


FIG 4B



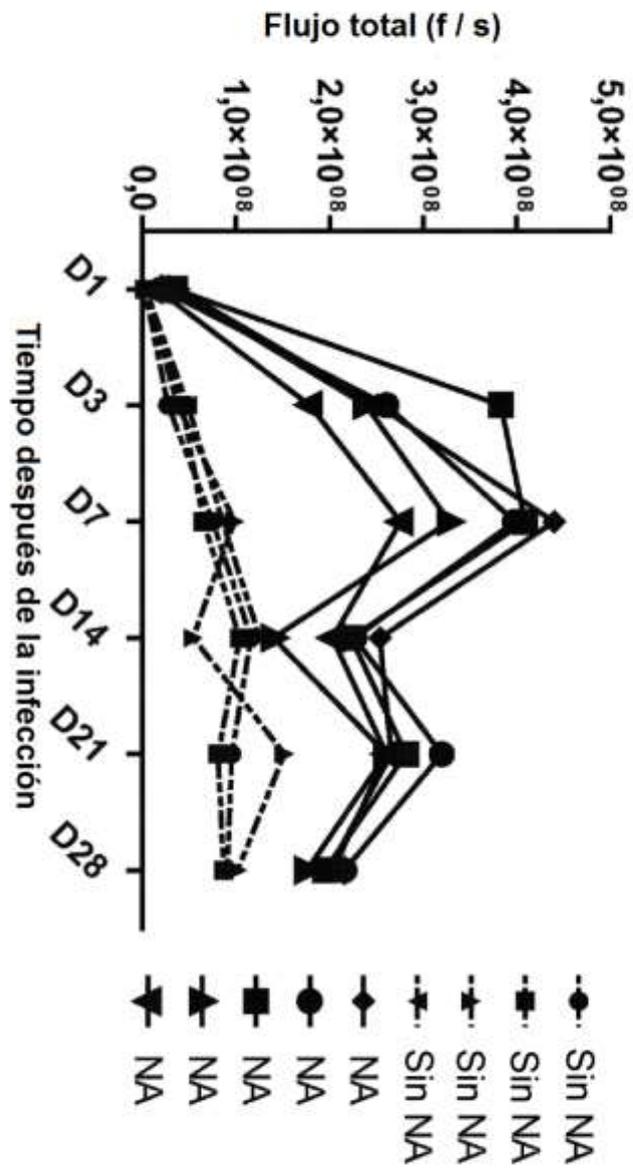


FIG. 5