

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 982 489**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/32** (2015.01)  
**A61K 48/00** (2006.01)  
**A61P 19/02** (2006.01)  
**A61K 38/20** (2006.01)  
**A61K 35/761** (2015.01)  
**C07K 14/545** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.08.2017** **PCT/US2017/047589**  
87 Fecha y número de publicación internacional: **22.02.2018** **WO18035451**  
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.08.2017** **E 17842207 (7)**  
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2024** **EP 3500278**

54 Título: **Composiciones para el tratamiento de afecciones que utilizan virus adeno-asociados recombinantes autocomplementarios**

30 Prioridad:

**19.08.2016 US 201662377297 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**16.10.2024**

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF FLORIDA RESEARCH  
FOUNDATION, INCORPORATED (100.0%)  
223 Grinter Hall  
Gainesville, FL 32611, US**

72 Inventor/es:

**BARTLETT, JEFFREY, S.**

74 Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

### Observaciones:

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

ES 2 982 489 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Composiciones para el tratamiento de afecciones que utilizan virus adeno-asociados recombinantes autocomplementarios

## REFERENCIA CRUZADA

- 5 La presente solicitud reivindica prioridad con respecto a la solicitud de patente provisional estadounidense n.º 62/377.297 presentada el 19 de agosto de 2016.

## REFERENCIA AL LISTADO DE SECUENCIAS

- 10 El solicitante afirma que la información registrada en forma de un archivo de texto del Anexo C/ST.25 presentado en virtud de la Regla 13ter.1.a), titulado CALIM \_16\_02\_PCT\_Sequence\_Listing\_ST25.txt, es idéntica a la que forma parte de la solicitud internacional tal como fue presentada. El contenido del listado de secuencias se incorpora aquí por referencia en su totalidad.

## CAMPO DE LA INVENCION

- 15 La presente invención se refiere a la terapia génica y a las composiciones para la terapia génica, más particularmente al virus adeno-asociado autocomplementario recombinante (sc-rAAV) y a los procedimientos para tratar afecciones o síntomas de afecciones utilizando sc-rAAV.

## ANTECEDENTES

- 20 La osteoartritis (OA) afecta a más de 27 millones de estadounidenses y es la principal causa de discapacidad entre las personas mayores. Los pacientes con OA también tienen un mayor riesgo de muerte. Se calcula que el coste de OA en nuestro sistema sanitario supera los 100.000 millones de dólares anuales. Estas estadísticas reflejan el hecho de que la osteoartritis es incurable y muy resistente al tratamiento.

- 25 El síntoma más precoz y predominante de la OA es el dolor. Suele aparecer en una fase avanzada del proceso de la enfermedad, momento en el que suele haber una alteración estructural considerable en la articulación afectada, incluida la pérdida de cartílago articular, la esclerosis del hueso subcondral, la formación de osteofitos y la inflamación sinovial. En las articulaciones de la rodilla, también se producen daños en los meniscos. En ausencia de fármacos modificadores de la enfermedad para la osteoartritis (DMOAD) que detengan o reviertan la progresión de la enfermedad, los tratamientos actuales son paliativos. Dado que actualmente no existe ninguna forma eficaz de intervenir en el proceso de la enfermedad, muchos pacientes progresan hasta el punto de necesitar una cirugía de sustitución total de la articulación. Aunque se trata de un procedimiento satisfactorio, implica una intervención quirúrgica importante y costosa con una amplia rehabilitación. En muchos casos, es necesaria una cirugía de revisión para sustituir una articulación protésica que se ha vuelto disfuncional.

- 30 En ausencia de DMOADs, el estándar actual de cuidados es paliativo. Como se refleja en las directrices más recientes para el tratamiento de la OA de rodilla (la articulación diana de esta IND) publicadas por el Colegio Americano de Reumatología (ACR) en 2012 y la Academia Americana de Cirujanos Ortopédicos (AAOS) en 2013, los enfoques actuales del tratamiento se dividen en tres categorías progresivas. La terapia no farmacológica incluye una serie de estrategias como la educación del paciente y la autoayuda, los programas de ejercicio y la pérdida de peso. La terapia farmacológica incluye el uso de paracetamol, antiinflamatorios no esteroideos (AINE), opiáceos y la inyección intraarticular de glucocorticoides o ácido hialurónico. Los AINE proporcionan un alivio parcial a muchos pacientes, pero se asocian a hemorragias digestivas altas e insuficiencia renal, lo que resulta especialmente preocupante en el contexto actual, ya que muchos pacientes con osteoartritis son de edad avanzada. La inyección intraarticular de glucocorticoides produce un alivio rápido en muchos casos, pero los efectos suelen persistir sólo unas semanas. La inyección repetida de glucocorticoides es poco práctica y está contraindicada debido a la preocupación por la infección y a la evidencia de que las dosis altas y sostenidas de glucocorticoides dañan el cartílago articular. Los beneficios de la inyección intraarticular de ácido hialurónico (viscosuplementación) son controvertidos; el ACR no hace ninguna recomendación al respecto, mientras que la AAOS ya no la recomienda. La inyección intraarticular de células madre mesenquimales (CMM) y hemoderivados autólogos, como el plasma rico en plaquetas, es cada vez más popular, pero no está aprobada por la FDA para la OA. Las últimas recomendaciones de la Osteoarthritis Research Society International y la Liga Europea contra el Reumatismo para el tratamiento de la OA de rodilla no difieren mucho de las de la ACR y la AAOS. Las recomendaciones de los distintos organismos ponen de manifiesto la escasez de opciones terapéuticas para la OA y la falta total de intervenciones farmacológicas de eficacia fiable. Incluso cuando hay alguna respuesta a la terapia, ésta sólo aborda los signos y síntomas, no la progresión de la enfermedad. Cuando el tratamiento no consigue controlar los síntomas y la progresión de la OA, puede estar indicada la intervención quirúrgica.

El lavado y desbridamiento artroscópico se ha utilizado ampliamente para proporcionar alivio sintomático, pero su uso ha disminuido tras demostrarse que sus efectos no son mayores que los del placebo. A veces se realiza una osteotomía para realinear las fuerzas en la articulación de la rodilla, de modo que la carga sea soportada ahora por zonas de cartílago intacto. Esta medida puede proporcionar alivio durante varios años, hasta que el cartílago articular que acaba de soportar el peso se erosiona y reaparecen los síntomas. En general, la osteotomía se considera una táctica dilatoria que permite ganar tiempo hasta la implantación quirúrgica de una prótesis de rodilla. Muchos pacientes evolucionan hasta el punto de necesitar una sustitución total de la articulación, y el año pasado se implantaron quirúrgicamente más de 700.000 rodillas artificiales en Estados Unidos.

La IL-1 es un potente mediador tanto de la condrolisis condrocítica como de la supresión de la síntesis de matriz por los condrocitos. Juntos, estos dos procesos son altamente destructivos para el cartílago. También se ha demostrado que la IL-1 inhibe la condrogénesis pero, al mismo tiempo, promueve ciertos aspectos de la diferenciación osteogénica que podrían ayudar a explicar la formación de osteofitos y la esclerosis del hueso subcondral. Paradójicamente, la IL-1 también promueve la actividad osteoclástica. Al estimular tanto la osteogénesis como la osteólisis, la IL-1 aumentaría el recambio óseo, como se observa en el hueso subcondral durante la OA. Por último, la IL-1 está bien posicionada para provocar los cambios inflamatorios que se observan en la OA. Se conocen sus actividades pirogénicas y la expresión de cantidades insignificantes de IL-1 en las articulaciones de la rodilla de conejos es suficiente para provocar una sinovitis pronunciada.

Al estudiar el cartílago recuperado de articulaciones humanas con OA, se descubrió que la producción de IL-1 por los condrocitos era muy elevada y se mantenía de forma autocrina. Además, las células no produjeron IL-1 Ra. Esto sugiere una mayor activación autocrina y paracrina de los condrocitos por la IL-1 en ausencia de su principal inhibidor fisiológico durante la OA. El aumento de la capacidad de respuesta de los condrocitos a la IL-1 en la OA también quedó indicado por el aumento de la expresión del receptor de IL-1 de tipo I, el receptor de señalización, en los condrocitos de la OA. La producción y el consumo local de IL-1 por los condrocitos pueden ayudar a explicar por qué las concentraciones de IL-1 en el líquido sinovial tienden a ser bajas, incluso en la OA. Asimismo, los análisis genéticos han identificado polimorfismos de nucleótido único (SNP) en el gen humano que codifica la IL-1 Ra (IL1 RN) y elementos reguladores que se correlacionan con la incidencia y gravedad de ciertos tipos de OA.

La administración dirigida de fármacos es un problema importante para el tratamiento intraarticular de enfermedades articulares. Las moléculas de todos los tamaños, así como las partículas, se eliminan rápidamente de las articulaciones a través de los capilares linfáticos, subsinoviales o ambos. Esto dificulta la consecución de dosis terapéuticas sostenidas de fármacos anti-OA en las articulaciones. Para ello, pueden administrarse moléculas pequeñas por vía sistémica, pero las proteínas son difíciles de administrar de esta manera debido a las limitaciones dependientes del tamaño para atravesar el endotelio fenestrado de los capilares sinoviales. Además, la administración sistémica expone las zonas no diana a dosis elevadas del fármaco, lo que provoca efectos secundarios no deseados. La rápida salida de las proteínas de las articulaciones, con vidas medias de unas pocas horas, hace que la administración intraarticular sea potencialmente ineficaz. Por ejemplo, la IL-1 Ra recombinante (Kineret, Amgen Biologicals) se administra mediante inyección subcutánea diaria para tratar los síntomas de la AR. Sin embargo, la administración diaria no consigue mantener niveles séricos terapéuticos de IL-1 Ra entre inyecciones (Evans et al., 1996, Human Gene Therapy, 7:1261-1290; Evans et al., 2005, PNAS 102 (24): 8698-8703). Algunos estudios han utilizado la transferencia genética ex vivo para introducir la IL-1 Ra en el tratamiento de la OA. Sin embargo, estos enfoques son laboriosos y no parecen proporcionar una expresión génica a largo plazo (Frisbie et al., 2002, Gene Therapy 9(1): 12-20). Asimismo, varios estudios describen el uso de una inmunoglobulina de dominio variable dual (DVD-Ig) dirigida contra la IL-1 alfa y la IL-1 beta (por ejemplo, ABT-981) para tratar la osteoartritis (Kamath et al., 2011, Osteoarthritis and Cartilage 19S1:S64; Wang et al., 2015, Osteoarthritis and Cartilage 23:A398-399; Wang et al., 2014, Osteoarthritis y cartílago 22:S462- S463; Lacy et al., 2015, mAbs 7(3):605-619; Wu et al., 2009, mAbs 1 (4):339-347; Wang et al., 2014, Scientific Abstracts SAT0448 pág. 756; Goss et al., 2014, Scientific Abstracts SAT0447 pg. 755-756; US 2015/0050238; Wang et al., 2014 ACR/ARHP Annual Meeting Abstract Number 2237; Wang et al., 2015 ACR/ARHP Annual Meeting Abstract Number 318). Sin embargo, estos péptidos requieren una introducción sistémica repetida (por ejemplo, 4 dosis cada 2 semanas o 3 dosis cada 4 semanas, por ejemplo, mediante inyección subcutánea o infusión intravenosa) debido a su semivida relativamente corta (Wang et al., 2015, Osteoarthritis and Cartilage 23:A398-399; Wang et al., 2014, Osteoarthritis and cartilage 22:S462-S463; Evans et al., 2005, PNAS 102 (24): 8698-8703).

La presente invención presenta procedimientos y composiciones para administrar un producto génico terapéutico (p. ej., IL-1 Ra) de forma sostenida a una ubicación de interés, p. ej., articulaciones. La presente invención también presenta procedimientos y composiciones para tratar los síntomas de afecciones como la osteoartritis y la artritis reumatoide, entre otras. La presente invención también presenta procedimientos y composiciones para proporcionar a un individuo (por ejemplo, un humano) una cantidad terapéuticamente eficaz de un producto génico terapéutico (por ejemplo, IL-1 Ra). Los procedimientos y composiciones pueden incluir un virus adeno-asociado autocomplementario recombinante (sc-rAAV), en el que el sc-rAAV comprende una cápside modificada y un vector (por ejemplo, un vector sc-rAAV) empaquetado dentro de la cápside. El vector puede comprender un transgén (p. ej., una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de interés, p. ej., un producto génico terapéutico, p. ej., IL-1 Ra o una versión codón modificada de la misma) unido de forma operable a un promotor (p. ej., un promotor constitutivo). El producto génico terapéutico puede administrarse en un lugar de interés, por ejemplo, una articulación. Por ejemplo, para tratar la osteoartritis, el sc-rAAV puede introducirse en células (por ejemplo, condrocitos, sinoviocitos, etc.) de una

articulación mediante inyección intraarticular directa. La presente invención no se limita a las condiciones mencionadas, ni a la ubicación de interés (por ejemplo, la articulación).

Cabe señalar que Goodrich et al. (Molecular Therapy-Nucleic Acids, 2013, 2:e70) divulga en general un procedimiento de tratamiento de la osteoartritis mediante IL-1 Ra administrada por scAAV. Sin embargo, Goodrich et al. no identifica ni habilita específicamente ninguna secuencia particular de IL-1 Ra, por ejemplo, una secuencia de IL-1 Ra según la presente invención. En particular, el campo de la terapia génica es un área impredecible en la que no se puede asumir que una secuencia génica concreta para una proteína de interés se expresará de forma eficiente. Además, la terapia génica también es impredecible con respecto a la eficacia en el modelo animal en comparación con los seres humanos, por ejemplo, no se puede asumir que si un procedimiento particular es eficaz en un modelo animal que será eficaz en los seres humanos. Goodrich et al, 2015 (Gene Ther., 22(7): 536-545) se refiere a un enfoque terapéutico génico para tratar la osteoartritis en un modelo equino. Kay et al, 2006 (Mol. Ther., 13: S420-S421) se refiere a vectores de virus adeno-asociados autocomplementarios y su uso como vehículos para el tratamiento de artritis. Pan et al, 2000 (Arthritis Rheum., 43(2): 289-297) se refiere a la evaluación del vector rAAV-IL-1Ra en el tratamiento y la prevención de la artritis inducida por lipopolisacáridos (LPS). Kay et al, 2009 (J. Gene Med., 11(7): 605-614) se refiere a la evaluación de un AAV autocomplementario de doble cadena como vehículo para la administración intraarticular de genes. US 2015/031083 se refiere a un sistema de administración y expresión biológica basado en adenovirus para su uso en el tratamiento o la prevención de la osteoartritis en articulaciones humanas o de mamíferos.

## SUMARIO

La presente invención se define en las reivindicaciones anexas y se refiere a un gen agonista del receptor de interleucina 1, un virus adeno-asociado recombinante autocomplementario (sc-rAAV) que comprende dicho gen IL-1Ra, una composición que comprende dicho sc-rAAV, y usos de dichas composiciones.

La presente invención presenta un virus adeno-asociado autocomplementario recombinante (sc-rAAV). En algunas realizaciones, el sc-rAAV comprende una cápside AAV modificada y un vector empaquetado dentro de la cápside, en el que el vector comprende un gen IL-1 Ra modificado unido operativamente a un promotor y el gen IL-1 Ra modificado es al menos un 95% idéntico a la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, el promotor comprende un promotor CMV. En algunas realizaciones, la cápside modificada comprende al menos una parte del serotipo AAV2 y al menos una parte del serotipo AAV6. En algunas realizaciones, la cápside modificada comprende al menos una parte del serotipo AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el vector comprende además secuencias de poliadenilación de SV40 y de hormona de crecimiento bovina (bGH). En algunas realizaciones, el vector comprende además sitios donantes de empalme (SD) y aceptores de empalme (SA) de SV40. En algunas realizaciones, el vector comprende sc-rAAV2.5Hu-IL-1 Ra. En algunas realizaciones, el sc-rAAV forma parte de una composición.

En algunas realizaciones, el sc-rAAV comprende una cápside AAV modificada y un vector empaquetado dentro de la cápside, en el que el vector comprende un gen IL-1 Ra modificado unido operativamente a un promotor y el gen IL-1 Ra modificado codifica la proteína IL-1 Ra según SEQ ID NO: 6.

También se divulga en el presente documento un procedimiento para proporcionar a un humano que lo necesite (por ejemplo, un humano diagnosticado con osteoartritis o artritis reumatoide o en riesgo de padecerlas) una cantidad terapéuticamente eficaz del péptido agonista del receptor de interleucina-1 (IL-1 Ra). En algunas opciones, el procedimiento comprende introducir en una localización de interés (por ejemplo, mediante inyección intraarticular) una composición que comprende un virus adeno-asociado autocomplementario recombinante (sc-rAAV) según la presente invención. El sc-rAAV transduce el vector a las células en la localización de interés, en la que el gen modificado de IL-1 Ra se expresa para proporcionar al humano la cantidad terapéuticamente eficaz de dicho péptido IL-1 Ra.

La presente invención también presenta una composición que comprende un virus adeno-asociado autocomplementario recombinante (sc-rAAV) según la presente invención para su uso en un procedimiento de mejora de los síntomas de osteoartritis o artritis reumatoide en un humano. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende introducir en una localización de interés (por ejemplo, mediante inyección intraarticular directa) una composición que comprende un virus adeno recombinante autocomplementario (sc-rAAV) según la presente invención. El sc-rAAV transduce el vector a las células en la localización de interés, donde el gen IL-1 Ra modificado se expresa para proporcionar al humano una cantidad de péptido IL-1 Ra eficaz para mejorar los síntomas asociados con la osteoartritis o la artritis reumatoide.

La presente invención también presenta una composición que comprende un virus adeno-asociado autocomplementario recombinante (sc-rAAV) según la presente invención para su uso en un procedimiento de reparación de cartílago en un humano que lo necesite (por ejemplo, un humano diagnosticado con osteoartritis o artritis reumatoide o en riesgo de desarrollarlas). En algunas realizaciones, el procedimiento comprende introducir en una localización de cartílago (por ejemplo, mediante inyección intraarticular directa) una composición que comprende un virus adeno-asociado autocomplementario recombinante (sc-rAAV) según la presente invención. El sc-rAAV transduce el vector a las células en la localización del cartílago, donde se expresa el gen IL-1 Ra modificado para proporcionar al humano el péptido IL-1 Ra eficaz para reparar el cartílago.

La presente invención también presenta un procedimiento para proporcionar el péptido agonista del receptor de interleucina-1 (IL-1 Ra) a un área de inflamación. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende introducir en una localización de inflamación (por ejemplo, mediante inyección intraarticular) una composición que comprende un virus adeno-asociado autocomplementario recombinante (sc-rAAV) según la presente invención. El sc-rAAV transduce el vector a las células de la localización de la inflamación, en las que el gen modificado de IL-1 Ra se expresa para proporcionar a las células de la localización de la inflamación una cantidad terapéuticamente eficaz del péptido IL-1 Ra para reducir la inflamación.

En algunas realizaciones, la ubicación de interés es una articulación, sinovio, subsinovio, cápsula articular, tendón, ligamento, cartílago o músculo periarticular del ser humano. En algunas realizaciones, las células son condrocitos, sinoviocitos o una combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, el procedimiento se lleva a cabo una segunda vez en un momento posterior al momento en que el procedimiento se lleva a cabo por primera vez. En algunas realizaciones, el punto temporal es de al menos 3 meses. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende además la cointroducción de una terapia secundaria (por ejemplo, un glucocorticoide, hialuronano, plasma rico en plaquetas, recombinante, IL-1 Ra humana, o una combinación de los mismos) a la localización de interés en combinación con la composición.

También se divulga en el presente documento un procedimiento de administración del péptido IL-1 Ra a un condrocito o sinoviocito. En algunas opciones, el procedimiento comprende poner en contacto el condrocito o sinoviocito con un virus adeno-asociado autocomplementario recombinante (sc-rAAV) según la presente invención, por ejemplo una cápside de virus adeno-asociado (AAV) modificada que comprende al menos una porción del serotipo 2 y al menos una porción del serotipo 6 y un vector empaquetado dentro de la cápside, en el que el vector comprende un gen IL-1 Ra modificado unido operativamente a un promotor CMV y el gen IL-1 Ra modificado es al menos un 95% idéntico a SEQ ID NO: 2. El sc-rAAV transduce el vector al condrocito o sinoviocito y el gen modificado de IL-1 Ra se expresa para proporcionar el péptido IL-1 Ra al condrocito o sinoviocito.

Para los procedimientos y composiciones antes mencionados, y los usos de dichas composiciones (por ejemplo, un procedimiento para proporcionar a un humano que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz del péptido agonista del receptor de interleucina-1 (IL-1 Ra), un procedimiento para mejorar los síntomas de osteoartritis o artritis reumatoide en un humano, un procedimiento para administrar el péptido IL-1 Ra a un condrocito o sinoviocito, una composición que comprende un virus adeno-asociado autocomplementario recombinante (sc-rAAV), un vector de virus adeno-asociado recombinante autocomplementario (sc-rAAV) que comprende un gen IL-1 Ra modificado unido operativamente a un promotor CMV, un procedimiento de reparación de cartílago en un canino que lo necesita, un procedimiento de suministro de péptido agonista del receptor de interleucina-1 (IL-1 Ra) a una zona de inflamación, etc.), el gen IL-1 Ra modificado es al menos un 95% idéntico SEQ ID NO: 2 y puede codificar IL-1 Ra según SEQ ID NO: 6.

Cualquier característica o combinación de características descritas aquí están incluidas dentro del alcance de la presente invención siempre que las características incluidas en cualquier combinación no sean mutuamente inconsistentes como será aparente del contexto, esta especificación, y el conocimiento de uno de habilidad ordinaria en el arte. En la siguiente descripción detallada se ponen de manifiesto otras ventajas y aspectos de la presente divulgación.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

FIG. 1 muestra el plásmido sc-rAAV2.5Hu-IL-1 Ra, que contiene un ADNc modificado que codifica la proteína humana IL-1 Ra bajo el control del promotor CMV. El inserto genético también contiene secuencias de poliadenilación de SV40 y de la hormona de crecimiento bovina (bGH), así como sitios donantes de empalme (SD) y aceptores de empalme (SA) de SV40. La región entre repeticiones terminales invertidas (TR) se ha verificado mediante secuenciación.

## TÉRMINOS

A menos que se explique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente entiende una persona con conocimientos ordinarios en la técnica a la que pertenece la invención divulgada. Los términos en singular "un", "uno, una" y "el, la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Del mismo modo, se entiende que la palabra "o" incluye "y" a menos que el contexto indique claramente lo contrario. "Comprender" significa "incluir" Por lo tanto, "que comprende A o B" significa "que incluye A" o "que incluye B" o "que incluye A y B"

A continuación se describen procedimientos y materiales adecuados para la práctica y/o ensayo de la divulgación. Dichos procedimientos y materiales son meramente ilustrativos y no pretenden ser limitativos. Pueden utilizarse otros procedimientos y materiales similares o equivalentes a los aquí descritos. Por ejemplo, los procedimientos convencionales bien conocidos en la técnica a la que pertenece la divulgación se describen en diversas referencias generales y más específicas, incluyendo, por ejemplo, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3d ed., Cold Spring Harbor Press, 2001; Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates,

1992 (y Suplementos hasta 2000); Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, 4ª ed., Wiley & Sons, 1999; Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990 y Harlow y Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999.

- 5 Aunque pueden utilizarse procedimientos y materiales similares o equivalentes a los aquí descritos para practicar o probar la tecnología divulgada, a continuación se describen procedimientos y materiales adecuados. Los materiales, procedimientos y ejemplos son meramente ilustrativos y no pretenden ser limitativos.

Para facilitar la revisión de las diversas realizaciones de la divulgación, se proporcionan las siguientes explicaciones de términos específicos:

- 10 **Virus adenoasociado (AAV), AAV recombinante (rAAV) y AAV recombinante autocomplementario (sc-rAAV):** El AAV es un virus pequeño (20 nm) de la familia Parvoviridae. No se sabe que el AAV cause enfermedades. El AAV se ha utilizado recientemente para la terapia génica por diversas razones, entre ellas que ha demostrado tener una baja inmunogenicidad, la capacidad de transducir eficazmente células que no se dividen y la capacidad de infectar diversos tipos de células y tejidos. El AAV recombinante (rAAV) no contiene secuencias codificantes virales nativas. El ADN recombinante del AAV se empaqueta en la cápside vírica como una molécula monocatenaria de unos 4.600 nucleótidos de longitud. Tras la infección de la célula por el virus, la maquinaria molecular de la célula convierte la cadena simple de ADN en una forma de doble cadena. Sólo la forma de ADN de doble cadena es útil para las proteínas de la célula que transcriben el gen o genes contenidos en ARN. El AAV autocomplementario (sc-rAAV) es una forma modificada del rAAV que puede formar una plantilla intramolecular de ADN de doble cadena. Así, tras la infección, las dos mitades complementarias del sc-rAAV se asociarán para formar una unidad de ADN de doble cadena que estará lista para su replicación y síntesis inmediatas.

**Expresión:** La traducción de una secuencia de ácido nucleico en una proteína. Las proteínas pueden expresarse y permanecer intracelulares, convertirse en un componente de la membrana de la superficie celular o ser secretadas a la matriz extracelular o al medio.

- 25 **Unido operativamente:** Una primera secuencia de ácido nucleico está unida operativamente con una segunda secuencia de ácido nucleico cuando la primera secuencia de ácido nucleico se coloca en una relación funcional con la segunda secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor está unido operativamente a una secuencia codificante si el promotor afecta a la transcripción o expresión de la secuencia codificante.

- 30 **Vehículos farmacéuticamente aceptables:** Los portadores (vehículos) farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, soluciones, pueden ser convencionales pero no se limitan a vehículos convencionales. Por ejemplo, E. W. Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15ª edición (1975) y D. B. Troy, ed. Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore MD y Philadelphia, PA, 21ª Edición (2006) describen composiciones y formulaciones adecuadas para la administración farmacéutica de uno o más compuestos o moléculas terapéuticos. En general, la naturaleza del portador dependerá del modo concreto de administración empleado. Además de portadores biológicamente neutros, las composiciones farmacéuticas administradas pueden contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas, como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes y agentes amortiguadores del pH y similares, por ejemplo acetato sódico o monolaurato de sorbitán.

- 40 **Prevenir, tratar, gestionar o mejorar una afección:** "Prevenir" una enfermedad puede referirse a inhibir el pleno desarrollo de una afección. "Tratar" puede referirse a una intervención terapéutica que mejora un signo o síntoma de una enfermedad o condición patológica después de que haya empezado a desarrollarse. "Controlar" puede referirse a una intervención terapéutica que no permite que empeoren los signos o síntomas de una enfermedad o afección. "Mejorar" puede referirse a la reducción del número o la gravedad de los signos o síntomas de una enfermedad o afección.

- 45 **Identidad de secuencia:** La identidad (o similitud) entre dos o más secuencias de ácido nucleico se expresa en términos de identidad o similitud entre las secuencias. La identidad de secuencias puede medirse en términos de porcentaje de identidad; cuanto mayor es el porcentaje, más idénticas son las secuencias. La similitud de secuencias puede medirse en términos de porcentaje de similitud (que tiene en cuenta las sustituciones conservadoras de aminoácidos); cuanto mayor es el porcentaje, más similares son las secuencias. Los procedimientos de alineación de secuencias para su comparación son bien conocidos en la técnica. Varios programas y algoritmos de alineación se describen en: Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482, 1981; Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443, 1970; Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444, 1988; Higgins & Sharp, Gene, 73:237-44, 1988; Higgins & Sharp, CABIOS 5:151-3, 1989; Corpet et al., Nuc. Acids Res. 16:10881-90, 1988; Huang et al. Computer Appls. in the Biosciences 8, 155-65, 1992 y Pearson et al., Meth. Mol. Bio. 24:307-31, 1994. Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-10, 1990 presenta un examen detallado de los procedimientos de alineación de secuencias y los cálculos de homología. La herramienta de búsqueda de alineación local básica (BLAST) del NCBI (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-10, 1990) está disponible en varias fuentes, incluido el National Center for Biotechnology (NCBI, National Library of Medicine, Building 38A, Room 8N805, Bethesda, MD 20894) y en Internet, para su uso en conexión con los programas de análisis de secuencias blastp, blastn, blastx, tblastn y tblastx. Encontrará más información en el sitio

web del NCBI. BLASTN puede utilizarse para comparar secuencias de ácidos nucleicos, mientras que BLASTP puede utilizarse para comparar secuencias de aminoácidos. Si las dos secuencias comparadas comparten homología, el archivo de salida designado presentará esas regiones de homología como secuencias alineadas. Si las dos secuencias comparadas no comparten homología, el archivo de salida designado no presentará secuencias alineadas. La herramienta de alineación tipo BLAST (BLAT) también puede utilizarse para comparar secuencias de ácidos nucleicos (Kent, Genome Res. 12:656-664, 2002). BLAT está disponible en varias fuentes, como Kent Informatics (Santa Cruz, CA) y en Internet (genome.ucsc.edu). Una vez alineadas, el número de coincidencias se determina contando el número de posiciones en las que se presenta un residuo de nucleótido o aminoácido idéntico en ambas secuencias. El porcentaje de identidad de secuencia se determina dividiendo el número de coincidencias por la longitud de la secuencia establecida en la secuencia identificada, o por una longitud articulada (como 100 nucleótidos consecutivos o residuos de aminoácidos de una secuencia establecida en una secuencia identificada), y multiplicando el valor resultante por 100. Por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico que tiene 1 166 coincidencias cuando se alinea con una secuencia de prueba que tiene 1554 nucleótidos es idéntica a la secuencia de prueba en un 75,0 por ciento ( $1\,166 \div 1554 \times 100 = 75,0$ ). El porcentaje de identidad de secuencia se redondea a la décima más próxima.

**Cantidad terapéuticamente eficaz:** Cantidad de un agente específico suficiente para lograr un efecto deseado en un sujeto tratado con dicho agente. Tales agentes pueden incluir IL-1 Ra. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de IL-1 Ra puede ser una cantidad suficiente para prevenir, tratar o mejorar los síntomas de la osteoartritis o la artritis reumatoide. La cantidad terapéuticamente eficaz de un agente útil para prevenir, mejorar y/o tratar a un sujeto dependerá del sujeto a tratar, del tipo y gravedad de la afección y de la forma de administración de la composición terapéutica.

**Transducida:** Una célula transducida es una célula en la que se ha introducido una molécula de ácido nucleico mediante técnicas de biología molecular. Tal y como se utiliza en el presente documento, el término transducción abarca todas las técnicas mediante las cuales se puede introducir una molécula de ácido nucleico en dicha célula, incluida la transfección con virus o vectores virales, la transformación con vectores plasmídicos y la introducción de ADN desnudo mediante electroporación, lipofección y aceleración con pistola de partículas. Estas células se denominan a veces células transformadas.

**Vector:** Una molécula de ácido nucleico introducida en una célula huésped, produciendo así una célula huésped transformada. Un vector puede incluir secuencias de ácido nucleico que le permiten replicarse en una célula huésped, como un origen de replicación. Un vector puede carecer de las secuencias de ácido nucleico que le permiten replicarse en una célula huésped. Un vector también puede incluir un gen de interés, uno o más genes marcadores seleccionables, otros elementos genéticos conocidos en la técnica, o cualquier otro inserto apropiado.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente divulgación presenta procedimientos y composiciones para administrar un producto génico terapéutico (por ejemplo, IL-1 Ra) de manera sostenida a una ubicación de interés, por ejemplo, una articulación. La presente divulgación también presenta procedimientos y composiciones para tratar síntomas de afecciones tales como la osteoartritis o la artritis reumatoide, entre otras. La presente divulgación también presenta procedimientos y composiciones para proporcionar a un individuo (por ejemplo, un humano) una cantidad terapéuticamente eficaz de un producto génico terapéutico (por ejemplo, IL-1 Ra). Los procedimientos y composiciones pueden presentar un virus adeno-asociado autocomplementario recombinante (sc-rAAV), en el que el sc-rAAV comprende una cápside modificada y un vector (un vector sc-rAAV) empaquetado dentro de la cápside. El vector puede comprender un transgén (p. ej., una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de interés, p. ej., un producto génico terapéutico, p. ej., IL-1 Ra o una versión modificada de la misma) unido operativamente a un promotor (p. ej., un promotor constitutivo).

Como se discutió previamente, la presente invención presenta composiciones que comprenden un vector de virus adeno-asociado autocomplementario recombinante (sc-rAAVs). Un ejemplo no limitativo de vector sc-rAAV se muestra en SEQ ID NO: 1 de la Tabla 1. a continuación El vector sc-rAAV de SEQ ID NO: 1 comprende un gen IL-1 Ra modificado. En algunas realizaciones, el vector comprende secuencias de poliadenilación SV40. En algunas realizaciones, el vector comprende secuencias de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (bGH). En algunas realizaciones, el vector comprende sitios donantes de empalme (SD) y aceptores de empalme (SA) de SV40. El vector sc-rAAV no se limita a SEQ ID NO: 1.

Los vectores sc-rAAV comprenden un ácido nucleico que codifica un péptido de interés. También en este caso, el ácido nucleico es al menos un 90% idéntico a SEQ ID NO: 2. También en este caso, el ácido nucleico es al menos un 92% idéntico a SEQ ID NO: 2. También en este caso, el ácido nucleico es al menos un 94% idéntico a SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, el ácido nucleico es al menos un 95% idéntico a SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, el ácido nucleico es al menos un 96% idéntico a SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, el ácido nucleico es al menos un 97% idéntico a SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, el ácido nucleico es al menos un 98% idéntico a SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, el ácido nucleico es al menos un 99% idéntico a SEQ ID NO: 2. Ejemplos no limitantes de tales secuencias de ácido nucleico pueden encontrarse en la Tabla 1 a continuación. Por ejemplo, SEQ ID NO: 3 es una secuencia para una IL-1 Ra humana modificada que es aproximadamente un 98% idéntica a SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 4 es una secuencia para una IL-1 Ra humana modificada que es aproximadamente un 99% idéntica a

SEQ ID NO: 2; y (nótese que las letras en negrita en la Tabla 1 son sustituciones de nucleótidos en comparación con SEQ ID NO: 2, y el codón subrayado).

### Tabla 1

SEQ ID NO:	DESCRIPCIÓN	SECUENCIA
1	Secuencia del plásmido Hu-IL-1Ra que contiene la secuencia viral completa con el inserto IL1Ra humano modificado (subrayado) y los sitios de restricción SacII / NotI en negrita y cursiva.	<p> CAATTAATGAATCGGCCAAACGCGCGGGGAGAGAGCGGCTTCGGTATIGGG  CGCTCTTCGGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTCGCTCGCTCGCTCGG  CTCGCGGCGAGCGGCTACAGCTACCTCAAGGCGGTAATACCGGTTATCC  ACAGAAATCGCGGATACACCGAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAG  CAAAAGSOTAGGAACCGTAAAGAGCGCGCTTCCTGCGCTTTTTCAT  AGGCTCCCGCCCGCTGACGAGCATACAAAAATCGACGCTCAAGTCAG  AGGTGCGGAACCCGACAGGACTATAAAGATACCGAGCGCTTTCGCCCT  GGAAGCTCCCTCGTCCGCTCTCTCTTCGCGACCTCGCGCTTACCGGA  TACCTTCGCGCTTTCCTCGCTTCGCGAAGCGTGGCGCTTTCCTCATAGC  TCAGCGCTGAGGATCTCAGTTCGGTGTAGGCTCGTTCGCTTCAGGCTG  GGCTGTGTGACGAGACCTCCCGCTTCAGCGCGGACCGCTCGCGCTTATCC  GGTAACTATCTCTCTGAGTCAACCCGCTAAGACAGGACTTATCGCA  CTGGCAGCGAGCGCTCTGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGCTATGTAGG  GGTCTTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCTTAACACGCTTACACTAGA  AGACAGTATTTGGTATCTCGCGCTCTGCTGAAGGCGAGTACCTTCGGA  AAAAAGATTTGGTAGCTCTTGAATCGGCAAAACAAACCGCGCTGTAGC  GGTGGTTTTTTTCTTTCGTAAGCAGAGGATTAACCGCGAGAAAAAAGGA  TCTCAAGAGATCTCTTTCGATCTTTCTTACCGGCTTCGAGCTTCAGTGG  AAGCAAACTCAAGCTTAAGGATTTTGGTCTATGAGATATCAAAAGAG  ATCTTCGCTACATCTCTTTTAAATTAATAATCAAGTTTAAATCAATC  TAAAGTATATATGAGTAAACTTGGCTTCAGAGTTACCAATGCTTAAATC  AGTGAGGACCTATCTCAGCGATCTGTCATTTTGGTTTCAATCCATAGTT  GGCTGACTCCCGCTCTGTATAGATAACTAGATACCGGAGGCTTACCA  TCTGGCGGCTAGTCTGCAATGATACCGGAGAGCGGCTTACCGGCT  CGAGATTATCAGCATATAAACAGCGAGCGGCGGAGGCGGCGAGGCA  AGTGTCTCTTCAAGCTTATTCGCGCTTCTATCCAGCTCTATTAATGCTTGC  CGGAGAGCTAGAGTAAAGTATTCGCTAGTCTTAAATAGTTTTCGCTAGGCT  GTGGCGATTTGCTACAGGCTCTGCGGCTTCAAGCTCTGCTTGTATG  GCTTATTCAGCTCTCGGCTTCGCGAGATCAAGGCGAGTTACAGATCC  CCCATGTTTCTGCAAAAGAGCGGTTAGCTCTCTCGGCTCTCGGATGCT  GTCAGAGTAAAGTTTGGCGGAGTGTATCTATCTATGTTTATGCTAGCA  CTGCAATATCTCTTACCTGCTATGCGGCTTCTGTAAGATGCTTTTCGCTG  ACTGTTGAGTACTCAACCAAGCTATCTTGAAGATAGTGTATGCGGCGA  CGAGTCTGCTCTTGGCGGCGGCTCAATACCGGATAAATACCGGCGAGAT  AGCAGAACTTTAAAGTCTCTATCTATTCGGAAGAGCTTCTTCGGGCGA  AAACTCTCAAGGATCTTACCGGCTTGTAGATCCAGTTGATGTAACCTC  ACTGTTTCAACCGGAGCTATCTTCAAGCTCTTTTACTTTCACCGGCT  TCTGGTGTAGTAAAAACAGGAGGCAAAATGCGCAAAAGGGAATA  AGGCGGACAGCGAAAGTGTAAATAGCTATCTCTCTCTTTTAAATAT  TATTAAGCATTTATCAGGCTTATCTCTCTCAAGGCGGATATATATTT  GAATGTATTTAGAAAAATTAACAAATAGGCGGTTCTCGCGACATTTCC  CEAAAAATGCGACCTGAGCTCTAAGAAACCAATATATATCATGACATTA  AGCTATAAAAAATAGGCGTATCAACAGGCGCTTTTGGTCTCGCGGCTTTC  GGTGTAGCGGCTGAAACCTCTGACCATGCGAGCTCCCGGAGCGGCTC  ACAGCTTGTCTGTAAAGCGGATGCGGCGGAGCAGACAGCGGCTCAGGGC  GCGTCAGCGGCTTCTCGCGGCTTCTCGGCGCTTCTTAACTATCGCGCA  TCAGAGCGAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATGCGGCTGAGAAATACCG  CACAGATGCTTAAGGAGAAATACCGCATCAGGAATTCACATCCAA  TAAATCATCAGGCAAGGCAAGAAATAGCAAAATTAAGCAATTAAGC  CTCAGGCAATAAGCTAAATCGGTTGTAACAAAAACATTAATGACCTG  TAATACTTTTCCCGGAGAGCGCTTATTTCAACCGCAAGGATAAATAAT  TTTAAAGCTCTCATATATTTTAAATGCAATGCTCAGTAATGCTGAGC  TAAGATTTAAACCGGCTTAAGAAAGGCGGAGAGCAGTCAATCATCATC  AATATGATTTCAACCTTCTAGCTGATTAATTAATTAATGCGGAGAGGCT  AGCTATTTTTCAGAGCTCTTACAAACCTTATCAGGCTTATTCGCTCAG  AGCTTGAAGCAACAGAGAGATGATGAGCGCTTAATGCTTAAGCTAGC  ATGCTAATCATATGAGACCTCGGTTGATTAATCAGAAAGCGGCAAAAC  AGGAAGATTTGATTAAGCAAAATTTTAAATGTAAGCTTAAATATTTG  TTAAATATCGGCTTAAATTTTGTAAATCAGCTCATTTTAAACCA  TAGGCGGAAATCGGCAAAATTTCTTAAATTAAGAAATTAAGCTGAG  ATAGGCTTGAATGCTTCTTCAAGCTTTCAGACAGGCTTATTAAG  AACTGCGGCTTCAACGCTCAAGGCGGAAACCGCTTATCAGGCGGCT  GGCCCACTACCTGAACCATACCTTAAATCAAGTTTTTTTGGGCTCGAGC </p>



[illegible]

SEQ ID NO:	DESCRIPCIÓN	SECUENCIA
	nucleótidos dentro de un codón (el codón está subrayado))	<p>ATGGAAATCTGCAGAGGA<b>ACTGCGGAGGCCACTTAATTACCC</b><b>TACGCTT</b>  <b>TTCCCTGTTCCACAGCGAGCAATCTGCTCGGCCAGCGCGCGGAAGTCC</b>  <b>AGCAAGATGCGAGCTTTCCGCATCTGGGACGTGAAC</b><b>TAGAAAGCTTC</b>  <b>TACTTCCGGAACAACCTGCTGGTGGCGGATACCTCCAGCGGCCCAAC</b>  <b>GTGAACCTAGAAAGAGATCGACGTGGTGGCCATCGAGCCCCACGCC</b>  <b>CTGTTTCTGGGATCCACGGCGGGCAATGTGCTGAGCTGGGTGAAG</b>  <b>TCCGGCGACGAGACAAGACTGCAGCTGGAAGCGGTGAACATCACTGAC</b>  <b>CTGAGCGGAACCCGCAAGCAGGACAGAGATTCCGCTTCATCAGAGC</b>  <b>GACAGCGGCCCAACCACAGCTTTGAGAGCGGCCGCTGCTCGGCTGG</b>  <b>TTCTTGTACAGCCATGGAAGCTGAGCCAGCCGCTGCTGCTGACAAAC</b>  <b>ATGCTCGACCGAGCGGTGATGGTACCAAGTTCTATTTCAGAAGAT</b>  <b>GAGTAATAA</b></p>
4	Inserto IL-1Ra humano modificado (99% idéntico a SEQ ID NO: 2: las letras en negrita son sustituciones de nucleótidos dentro de un codón (el codón está subrayado))	<p>ATGGAGATCTGCAGAGG<b>CGCTGCGAGCCATCTGATTACCC</b><b>TACGCTT</b>  <b>TTCCCTGTTCCATAGCGAGACAATCTGCGGCCAGCGCGCGGAAGTCC</b>  <b>AGCAAAATGCGAGGCTTCCGCATCTGGGACGTGAAC</b><b>TAGAAAGCTTC</b>  <b>TACTTCCGGAACAACAGCTGCTGGCGGATACCTCCAGCGGCCCAAC</b>  <b>GTGAACCTGGAAGAGAGATCGACGTGGTGGCCATCGAGCCCCACGCC</b>  <b>CTGTTTCTGGGATCCACGGCGGCAAGATGTGCTGAGCTGGGTGAAG</b>  <b>TCCGGCGACGAGACAAGACTGCAGCTGGAGCGGTGAACATCACTGAC</b>  <b>CTGAGCGGAACCCGGAAGCAGGACAGAGATTCCGCTTCATCAGAGC</b>  <b>GACAGCGGCCCAACCACAGCTTTGAGAGCGGCCGCTGCTCGGCTGG</b>  <b>TTCTTGTGACAGCATGGAAGCGGACCGAGCCGCTGCTGCTGACAAAC</b>  <b>ATGCTCGAGCGAGCGCTGATGGTCAACCAAGTTCTATTTCAGAAGAT</b>  <b>GAGTAATAA</b></p>
5	Inserto IL-1Ra humano modificado (95% idéntico a SEQ ID NO: 2; las letras en negrita son sustituciones de nucleótidos dentro de un codón (el codón está subrayado))	<p><b>ATGGAGATCTGCAGAGGA</b><b>ACTGCGGAGGCCACTTAATTACCC</b><b>TACGCTT</b>  <b>TTCCCTGTTCCATAGCGAGACAATCTGCGGCCAGCGCGCGGAAGTCC</b>  <b>AGCAAAATGCGAGGCTTTCCGCATCTGGGACGTGAAC</b><b>TAGAAAGCTTC</b>  <b>TACTTCCGGAACAACAGCTGCTGGCGGATACCTCCAGCGGCCCAAC</b>  <b>GTGAACCTAGAAAGAGAGATCGACGTGGTGGCCATCGAGCCCCACGCC</b>  <b>CTGTTTCTGGGATCCATGGCGGCAAGATGTGCTGAGCTGGGTGAAG</b>  <b>TCCGGCGACGAGACAAGACTGCAGCTGGAGCGGTGAACATCACTGAC</b>  <b>CTGAGCGGAACCCGGAAGCAGGACAGAGATTCCGCTTCATCAGAGC</b>  <b>GACAGCGGCCCAACCACAGCTTTGAGAGCGGCCGCTGCTCGGCTGG</b>  <b>TTCTTGTGACAGCATGGAAGCGGACCGAGCCGCTGCTGCTGACAAAC</b>  <b>ATGCTCGAGCGAGCGCTGATGGTCAACCAAGTTCTATTTCAGAAGAT</b>  <b>GAGTAATAA</b></p>

En algunas realizaciones, el péptido IL-1 Ra codificado por el inserto IL-1 Ra comprende IL-1 Ra (véase SEQ ID NO: 6 en la Tabla 2).

Tabla 2

SEQ ID NO:	DESCRIPCIÓN	SECUENCIA
6	IL-1Ra (UNIPROT P18510)	<p>MEICRGLRSH LITLLFLFH SETICRPSGR KSSKMQAFRI  WDV NQKTFYL RNNQLVAGYL QGPNVNLEEK  IDVVP IEPHA LFLGIHG GKM CLSCVKSGDE  TRLQLEAVNI TDLSEN RKQD KRF AFIRSDS  GPTTSFESAA CPGWFLCTAM EADQPVSLTN  MPDEGVMVTK FYFQEDE</p>

5

El transgén (por ejemplo, la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de interés) está unido operativamente a un promotor. En algunas realizaciones, el promotor comprende el promotor del citomegalovirus (CMV). La presente invención no se limita al promotor CMV y puede presentar cualquier promotor apropiado o porciones de varios promotores. Algunos ejemplos de promotores son el promotor del CMV, el promotor híbrido del CMV, el promotor CAG, el promotor de la beta-actina humana, el promotor híbrido de la beta-actina, el promotor EF1, el promotor U1 a, el promotor 1M b, un promotor inducible por Tet, un promotor VP16-LexA, el promotor de la beta-actina de pollo (CBA),

10

el promotor del factor de elongación-1 alfa humano, el promotor del virus simio 40 (SV40) y el promotor de la timidina quinasa del virus del herpes simple.

En algunas realizaciones, el promotor comprende un promotor híbrido. A modo de ejemplo, la Tabla 3 muestra un promotor híbrido de IL-1 beta/IL-6 (véase también van de Loo et al., 2004, Gene Therapy 11:581-590). La presente invención tampoco se limita al promotor híbrido mostrado en la Tabla 3.

Tabla 3

SEQ NO:	ID DESCRIPCIÓN	SECUENCIA
7	Promotor híbrido IL-1 beta/ IL-6	<p>atccaagag ggagaagaag cccattggag atgatgccat aaenggaagtg  gaagcgatat gataaaaatc atagtgcaca ttoccaataa atcccagaag  cagaagggaaggaggagaaa tatccacaaa gacagggtgtg ggtacacaca  acattttca tactttaaga tcccagagga ctcattggaas tgatacaaga  aatgactca taagaacaaa tattaggaag ccagtgcaca gaatgagatg  ggaaattggg gaaaatgtg ggggcagatt gcttagttct gtctaaagca  agaggggtgaa caagggaagga acagctcact acaagaacaa gacatcactg  cagtacaca caataatata agaactaac caigattatt ttgctgtct tctgttcaa  aatgattgaa gaccaatgag atgagatcaa ccttgataac tggctggctt  cgccatgatt agacacaaga tggatcagg gcactgtgtg cttgaataa  tgicagtctc ctgtcttga agaataacct gacagggtaa agagggaact  gcagctgga aaggctttag tgactcaaga gctgaataat tcccacaaag  ctggagcact ctggcattc cagctcccca tctctgtctg ttccacttcc ttggggctac  atcaccatct acatcatcat cactcttcca ctccctcct tagtgccaac tatgttata  ggagatatt ttctgtcat tggggatgg aaggaaagtc ttgtgctga  gggtctctt tgggaagaca ggaatgata catagcttc acaacttatt  tgacataaga ggttccatt cctgagatgg atgggatgtt agcagatttg  ggtccagggt acaggggccag gatgagacat ggcagaactg tggagactgt  tacgtcaggg ggcattgccc catggctcca aaatttccct cgagc  ctctggccc caccctcacc ctccaacaaa gatattcaa atgtgggatt ttccatgag  tctcaatatt agagtctcaa ccccaataa atataggact ggagatgtct  gaggctcatt ctgcccctga gcccacggg aacgaaagag aagctctatc  tcccctcag gagccagct atgaactct tc</p>

En algunas realizaciones, el vector sc-AAV está empaquetado dentro de una cápside. En algunas realizaciones, la cápside comprende al menos una porción de AAV serotipo 1 (AAV1), AAV serotipo 2, (AAV2), AAV serotipo 3, (AAV3), AAV serotipo 4, (AAV4), AAV serotipo 5, (AAV5), AAV serotipo 6, (AAV6), derivados de los mismos, o combinación de los mismos. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la cápside comprende al menos una porción del serotipo 2 de AAV y al menos una porción del serotipo 6 de AAV, por ejemplo, AAV2.5.

La composición, por ejemplo, la composición que comprende el sc-AAV, puede introducirse en células en una localización de interés (por ejemplo, en un humano). Por ejemplo, en algunas realizaciones cuando se tratan síntomas de osteoartritis, la composición puede introducirse en células (por ejemplo, condrocitos, sinoviocitos, por ejemplo, tipo A, tipo B, etc.) en una articulación mediante inyección intraarticular directa. En algunas realizaciones, la composición se administra a una articulación, sinovial, subarticular, cápsula articular, tendón, ligamento, cartílago o músculo periarticular del ser humano. La presente invención no se limita a las afecciones mencionadas (p. ej., osteoartritis), los medios de administración (p. ej., inyección intraarticular), la ubicación de interés (p. ej., articulación) o el tipo de célula (p. ej., condrocitos, sinoviocitos). Por ejemplo, en algunas realizaciones, otros tipos celulares que pueden ser transducidos pueden incluir células madre mesenquimales.

El sc-AAV transduce el vector a las células y se expresa el péptido IL-1 Ra modificado. En algunas realizaciones, el péptido IL-1 Ra se expresa para proporcionar al ser humano una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho péptido IL-1 Ra modificado, eficaz para mejorar los síntomas asociados con diversas afecciones como la osteoartritis o la artritis reumatoide.

En algunas realizaciones, la introducción de la composición (por ejemplo, el sc-AAV) se realiza una vez. En algunas realizaciones, la introducción de la composición (por ejemplo, el sc-AAV) se realiza dos veces, por ejemplo, una primera vez y una segunda vez posterior a la primera. En algunas realizaciones, la introducción de la composición se realiza más de dos veces, por ejemplo, tres veces, cuatro veces, cinco veces, etc. La introducción de la composición una segunda vez puede realizarse en un momento posterior al momento en que se realiza el procedimiento por primera

vez, por ejemplo, después de 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses, 1 año, más de un año, etc.

La composición puede comprender cualquier composición farmacéutica apropiada. En algunas realizaciones, la composición comprende una solución tamponada. En algunas realizaciones, la solución tamponada comprende una solución salina tamponada con fosfato (PBS). En algunas realizaciones, la composición comprende además sorbitol, por ejemplo, sorbitol al 5%. En algunas realizaciones, la composición comprende además una sal, por ejemplo, NaCl. La concentración de sal puede ser cualquier concentración apropiada, por ejemplo, 350 mM NaCl, más de 350 mM NaCl, menos de 350 mM, etc.

En algunas realizaciones, la composición (por ejemplo, el sc-rAAV) se coadministra con una terapia secundaria. En algunas realizaciones, la terapia secundaria comprende una terapia para la osteoartritis o la artritis reumatoide o cualquier otra terapia apropiada para tratar los síntomas de la enfermedad. Entre los ejemplos no limitantes de terapias secundarias para la OA se incluyen los glucocorticoides, el hialuronano (viscosuplementación), el plasma rico en plaquetas y la IL-1 Ra humana recombinante (Anakinra; Kineret®). Por ejemplo, en algunas realizaciones, el sc-rAAV se coadministra con glucocorticoides o plasma rico en plaquetas.

Se hace referencia a los siguientes documentos de patente: US2008/0187576, US2009/0104155, KR2012041139, JP2015518816, WO2013151672, WO2008088895, US8529885, US7037492, US20070128177, US6491907, US8999948, US20150218586, US7892824, US20130295614, JP2002538770, JP2010516252, KR2002027450, KR2003028080, US6482634, US20090105148, US20120232130, US20140234255, US5756283, US6083716, WO2002038782, WO2007039699, WO2012047093, WO2014170470, WO2015018860, WO2015044292, WO2015158749, US7452696, US6943153, US6429001, WO2015031392, WO2004092211.

#### EJEMPLO 1

El Ejemplo 1 describe la administración de un sc-rAAV de la presente invención (que codifica IL-1 Ra). La presente invención no se limita a la divulgación del Ejemplo 1. Cinco pacientes se inscriben en un ensayo clínico que investiga la administración de un sc-rAAV de la presente invención. Los pacientes son los siguientes: (1) un varón de 65 años con artrosis en la rodilla derecha; (2) un varón de 59 años con artrosis en la rodilla izquierda; (3) una mujer de 58 años con artrosis en la rodilla izquierda; (4) un varón de 51 años con artrosis en la rodilla derecha; y (5) un varón de 48 años con artrosis en la rodilla derecha. A cada paciente se le administra el sc-rAAV mediante inyección intraarticular a  $1 \times 10^{12}$  genes virales por rodilla. La IL-1Ra se expresa en los condrocitos y sinoviocitos. El paciente 1 describe una mejoría de los síntomas relacionados con la OA en 2 semanas. El paciente 2 describe una mejoría de los síntomas relacionados con la OA en 1 semana. El paciente 3 describe una mejoría de los síntomas relacionados con la OA en 5 semanas. El paciente 4 describe una mejoría de los síntomas relacionados con la OA en 1 semana. A las 6 semanas, el paciente 5 no describe ninguna mejoría de los síntomas relacionados con la OA. EJEMPLO 2

El Ejemplo 2 describe una primera administración de un sc-rAAV de la presente invención (que codifica IL-1 Ra) y una segunda administración del mismo sc-rAAV de la presente invención después de un periodo de tiempo. La presente invención no se limita a la divulgación del Ejemplo 2. Un varón de 55 años presenta artrosis en la rodilla derecha. Su médico realiza una única inyección intraarticular del vector sc-rAAV de la presente invención (que codifica IL-1 Ra). Los síntomas del paciente desaparecen en 2 meses. Después de 6 meses, el médico administra una segunda (única) inyección intraarticular del mismo vector sc-rAAV (que codifica IL-1 Ra) de la presente invención. Los síntomas del paciente siguen ausentes 6 meses después de la segunda inyección.

#### EJEMPLO 3

El Ejemplo 3 describe una primera administración de un sc-rAAV de la presente invención (que codifica IL-1 Ra) y una segunda administración de un sc-rAAV de la presente invención (que codifica IL-1 Ra) diferente del primer sc-rAAV después de un periodo de tiempo. La presente invención no se limita a la divulgación del Ejemplo 3. Una mujer de 49 años presenta artrosis en el tobillo derecho. Su médico realiza una única inyección intraarticular del vector sc-rAAV de la presente invención (que codifica IL-1 Ra). Los síntomas del paciente han mejorado en 5 meses, pero no se han eliminado. Después de 6 meses, el médico administra una segunda (única) inyección intraarticular de un vector sc-rAAV diferente (que codifica IL-1 Ra) de la presente invención. Seis meses después de la segunda inyección, los síntomas del paciente desaparecen.

#### EJEMPLO 4

El Ejemplo 4 describe la coadministración de un sc-rAAV de la presente invención (que codifica IL-1 Ra) y una terapia secundaria. La presente invención no se limita a la divulgación del Ejemplo 4. Un varón de 68 años presenta artrosis en la rodilla izquierda. Su médico realiza una única inyección intraarticular de un vector sc-rAAV de la presente invención (que codifica IL-1 Ra) y plasma rico en plaquetas. Los síntomas del paciente desaparecen en 2 meses.

Aunque se han mostrado y descrito realizaciones de la presente invención, será evidente para los expertos en la materia que se pueden hacer modificaciones que no excedan el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Los números

- de referencia que aparecen en las reivindicaciones son sólo a título de ejemplo y para facilitar la revisión por parte de la oficina de patentes, y no son limitativos en modo alguno. En algunas realizaciones, las figuras presentadas en esta solicitud de patente están dibujadas a escala, incluidos los ángulos, las relaciones de dimensiones, etc. En algunas realizaciones, las figuras son únicamente representativas y las reivindicaciones no están limitadas por las dimensiones de las figuras. En algunas realizaciones, las descripciones de las invenciones descritas en el presente documento utilizando la expresión "que comprende" incluyen realizaciones que podrían describirse como "que consiste en", y como tal se cumple el requisito de descripción escrita para reivindicar una o más realizaciones de la presente invención utilizando la expresión "que consiste en".
- 5
- 10
- Todos los números de referencia que figuran en las reivindicaciones siguientes se indican únicamente para facilitar el examen de la presente solicitud de patente, son ejemplares y no pretenden en modo alguno limitar el alcance de las reivindicaciones a las características particulares que tienen los correspondientes números de referencia en los dibujos.

## REIVINDICACIONES

1. Un gen antagonista del receptor de interleucina 1 (IL-1Ra), en el que el gen IL-1Ra es al menos un 95% idéntico a SEQ ID NO: 2.
2. El gen IL-1Ra de la reivindicación 1, en el que el gen IL-1Ra codifica una proteína IL-1Ra según SEQ ID NO: 6.
- 5 3. Un virus adeno-asociado autocomplementario recombinante (sc-rAAV), en el que dicho sc-rAAV comprende:
  - (a). una cápside de AAV diseñada; y
  - (b). un vector empaquetado dentro de la cápside, dicho vector comprende un gen IL-1Ra unido operativamente a un promotor, en el que el gen IL-1Ra es al menos un 95% idéntico a SEQ ID NO: 2.
- 10 4. El sc-rAAV de la reivindicación 3, en el que el vector comprende además secuencias de poliadenilación de SV40 y de hormona de crecimiento bovina (bGH), opcionalmente en el que el vector comprende además sitios donantes de empalme (SD) y aceptores de empalme (SA) de SV40.
- 15 5. El sc-rAAV de la reivindicación 3 o 4, en el que la cápside modificada comprende al menos una parte del serotipo AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, o una combinación de los mismos, opcionalmente en el que la cápside modificada comprende al menos una parte del serotipo AAV2 y al menos una parte del serotipo AAV6.
6. El sc-rAAV de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en el que el promotor es un promotor CMV, opcionalmente en el que el vector comprende sc-rAAV2.5Hu-IL-1Ra.
7. El sc-rAAV de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en el que el gen IL-1Ra codifica una proteína IL-1Ra según SEQ ID NO: 6.
- 20 8. Una composición que comprende un virus adeno-asociado autocomplementario recombinante (sc-rAAV) como se define en cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7.
9. Una composición según la reivindicación 8 para su uso en un procedimiento de mejora de los síntomas de osteoartritis o artritis reumatoide en un sujeto humano que lo necesite, en el que el procedimiento comprende introducir la composición en una localización de interés, en el que el sc-rAAV transduce el vector a células en la localización de interés, en el que el gen IL-1Ra se expresa para proporcionar al sujeto una cantidad de péptido IL-1Ra eficaz para mejorar los síntomas asociados con la osteoartritis o la artritis reumatoide, opcionalmente en el que el lugar de interés es una articulación, sinovio, subsinovio, cápsula articular, tendón, ligamento, cartílago o músculo periarticular del sujeto.
- 25 10. Una composición según la reivindicación 8 para uso en un procedimiento de reparación de cartílago en un sujeto humano que lo necesite, en el que el procedimiento comprende introducir la composición en una localización de cartílago, en el que el sc-rAAV transduce el vector a células en la localización de cartílago, en el que el gen IL-1Ra modificado se expresa para proporcionar al sujeto una cantidad de péptido IL-1Ra eficaz para reparar el cartílago, opcionalmente en el que el sujeto está diagnosticado de osteoartritis o artritis reumatoide o tiene riesgo de desarrollarlas.
- 30 11. Una composición según la reivindicación 8 para uso en un procedimiento de suministro de péptido agonista del receptor de interleucina-1 (IL-1Ra) a una zona de inflamación en un sujeto humano, en el que el procedimiento comprende introducir la composición en una localización de inflamación, en el que el sc-rAAV transduce el vector a células en la localización de inflamación, en el que el gen IL-1Ra modificado se expresa para proporcionar al sujeto una cantidad de péptido IL-1Ra eficaz para reducir la inflamación, opcionalmente en el que la localización de la inflamación es una articulación, sinovio, subsinovio, cápsula articular, tendón, ligamento, cartílago o músculo periarticular del sujeto.
- 35 12. Una composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 9, 10 u 11, en la que la composición se introduce en la localización mediante inyección intraarticular directa y/u opcionalmente en la que las células son condrocitos, sinoviocitos o una combinación de los mismos.
- 40 13. Una composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en la que el procedimiento se realiza una segunda vez en un punto temporal después de que el procedimiento se realiza por primera vez, opcionalmente en el que el punto temporal es de al menos 3 meses después de que el procedimiento se realiza por primera vez.
- 45 14. Una composición para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, en la que el procedimiento comprende además administrar una terapia secundaria a la localización del cartílago en combinación con la composición, en la que la terapia secundaria comprende administrar un glucocorticoide, hialuronano, plasma rico en plaquetas, recombinante, IL-1Ra humana, o una combinación de los mismos.
- 50

Figura 1

