

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 628 419**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/86 (2006.01)
C12N 15/55 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.10.2012 PCT/GB2012/052668**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **02.05.2013 WO13061076**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.10.2012 E 12778779 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.05.2017 EP 2771471**

(54) Título: Construcción

(30) Prioridad:

28.10.2011 GB 201118636
28.10.2011 US 201161552581 P

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

02.08.2017

(73) Titular/es:

OXFORD BIOMEDICA (UK) LIMITED (100.0%)
Medawar Centre Robert Robinson Avenue
The Oxford Science Park Oxford OX4 4GA, GB

(72) Inventor/es:

MITROPHANOUS, KYRIACOS;
RALPH, SCOTT;
STEWART, HANNAH y
KINGSMAN, ALAN

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 628 419 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

Construcción

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a una construcción que comprende secuencias de nucleótidos que codifican actividades enzimáticas implicadas en la ruta de síntesis de dopamina. Al menos dos de las secuencias de nucleótidos están unidas de forma funcional de modo que codifican una proteína de fusión. Adicionalmente, se describe un genoma de vector vírico, un sistema de producción de vector y una partícula de vector vírico que comprende dicha secuencia de nucleótidos. La expresión de la secuencia de nucleótidos *in vivo*, por ejemplo, por terapia génica usando una partícula de vector vírico, causa la síntesis de dopamina que es útil en el tratamiento y/o la prevención de trastornos neurológicos caracterizados por una reducción o pérdida de neuronas productoras de dopamina, tal como la enfermedad de Parkinson.

15 Antecedentes de la invención

La enfermedad de Parkinson (PD) es un trastorno neurodegenerativo que se caracteriza por la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra. Finalmente da lugar a reducción de dopamina en el cuerpo estriado causando deficiencias motoras graves. Un tratamiento de la enfermedad de Parkinson es la administración oral de L-DOPA, el precursor de dopamina, que puede restaurar un grado de la función motora. Sin embargo, según progresa la enfermedad, la terapia con L-DOPA se vuelve menos eficaz en el tratamiento de las deficiencias motoras, requiriendo el uso de dosis mayores que tienen efectos secundarios graves.

25 El tratamiento mejorado de PD podría conseguirse por la liberación de dopamina directamente en el cuerpo estriado. Esto puede conseguirse por terapia génica. La terapia génica es atractiva para el tratamiento de PD porque la producción de proteína específica puede dirigirse a áreas específicas del SNC tal como el cuerpo estriado. La síntesis de dopamina a partir del aminoácido tirosina implica las enzimas tirosina hidroxilasa (TH), que cataliza la síntesis de L-DOPA a partir de tirosina y la aminoácido aromático descarboxilasa (AADC), que convierte L-DOPA en dopamina. Se cree que la etapa TH es limitante de la velocidad. TH requiere un cofactor para funcionar, tetrahidrobiopteroína (BH₄), cuya síntesis está catalizada por la enzima GTP-ciclohidrolasa 1 (CH-1).

35 Se han investigado estrategias de terapia génica usando vectores de virus adenoasociado (AAV) para administrar genes individuales a partir de la ruta biosintética de dopamina con algún beneficio en el comportamiento en modelos animales de PD (Leff et al., 1999 *Neuroscience* 92, 185-196; Bankiewicz et al., 2006 *Mol Ther* 14, 564-570). Estrategias adicionales mostraron que la administración simultánea de dos o más de las enzimas que median la síntesis de dopamina demostró mayor eficacia en modelos animales de PD (Fan et al., 1998 *Hum Gene Ther* 9, 2527-2535.; Shen et al., 2000 *Hum Gene Ther* 11, 1509-1519.; Muramatsu et al., 2002 *Hum Gene Ther* 13, 345-354).

40 Esto dio lugar a la teoría de que si las tres enzimas que sintetizan dopamina pudieran expresarse en conjunto y en la misma célula, entonces la síntesis de dopamina sería mayor y daría lugar a una mayor eficacia en PD. Sin embargo, debido a la limitada capacidad de empaquetado de los vectores AAV, está limitada la cantidad de genes que puede administrarse. Por tanto, se decidió usar un vector lentivírico (LV) con este fin ya que la capacidad de empaquetado de estos vectores es mucho mayor. Los vectores lentivíricos (LV) son particularmente ventajosos para estrategias de terapia génica al sistema nervioso central (SNC) a causa de su capacidad de transducir de forma estable tipos de células que no están en división tales como neuronas. Se han desarrollado LV derivados de lentivirus que no son de primate, que se sabe que no son infecciosos o patogénicos para los seres humanos, tales como el virus de la anemia infecciosa equina (EIAV) y se estableció su capacidad de transducir células que no están en división.

45 ProSavin® es un LV basado en el virus de la anemia infecciosa equina (EIAV) para el tratamiento de PD. El genoma de ProSavin® es una construcción tricistrónica que comprende las secuencias codificantes de las tres enzimas clave biosintéticas de dopamina, TH, AADC y CH1 unidas de forma funcional por dos sitios internos de entrada del ribosoma (IRES). ProSavin® actualmente está en evaluación en un ensayo clínico en fase I/II con material de vector que se generó en un proceso que comprende tres co-transfecciones transitorias con plásmido de células HEK293T (Mitrophanous et al., 1999 *Gene Ther* 6, 1808-1818). El documento WO2002/29065 se refiere a un genoma de vector retrovírico que comprende dos o más NOI unidos de forma funcional por uno o más sitios internos de entrada del ribosoma.

50 Un objetivo de cualquier estrategia de terapia génica es aumentar el título del vector, de modo que puedan usarse volúmenes inferiores de preparación del vector. Este es un resultado particularmente deseable en un tratamiento de tipo ProSavin®, donde el vector se inyecta directamente en el cerebro, lo que necesita el uso de pequeños volúmenes.

55 Las estructuras secundarias complejas de los elementos IRES pueden actuar como impedimento para una transcripción inversa eficaz. Los autores de la presente invención, por lo tanto, sugirieron la hipótesis de que la eliminación de los elementos IRES debería aumentar el título de los vectores. Una opción sería remplazar los

elementos IRES con secuencias que codifican secuencias peptídicas cortas (conectores) para generar proteínas de fusión que comprenden dos o más de las tres actividades enzimáticas necesarias para la síntesis de dopamina. Sin embargo, como la forma nativa de TH existe como un homotetrámero (Goodwill et al., 1997 *Nat Struct Biol* 4, 578-585) y la de CH1 como un homodecámero (Nar et al., 1995 *Structure* 3, 459-466; Steinmetz et al., 1998 *J Mol Biol* 279, 189-199), la fusión de estas enzimas entre sí o con otras enzimas tales como AADC podría evitar la formación de la estructura terciaria correcta de las enzimas que entonces puede inhibir la función enzimática o evitar que funcionen a una capacidad máxima. En apoyo a esto, se ha informado previamente de que una fusión entre TH y β -galactosidasa es enzimáticamente inactiva (Wu y Cepko (1994) *J Neurochem* 62:863-72).

5 10 El documento WO1998/18934 se refiere a una secuencia polinucleotídica para su uso en terapia génica, comprendiendo dicha secuencia polinucleotídica dos o más genes terapéuticos unidos de forma funcional a un promotor, y codifica un producto de proteína de fusión de los genes terapéuticos.

15 15 Kuhn y Geddes (Mol Pharmacol 64:946-953, 2003) informaron de que los efectores de nitración de tirosina de ONOO⁻ y NO₂ en TH se evitan por BH₄ *in vitro* y en células intactas que expresan una proteína de fusión de la proteína fluorescente verde potenciada-TH como una construcción indicadora a tiempo real de la nitración de tirosina.

20 20 Wu et al., (Biochemical and Biophysical Research Communications 346 (2006) 1-6) evaluaron si la proteína de fusión de la tirosina hidroxilasa (TH) conjugada con el dominio de transducción de proteínas (PTD) era eficaz sobre las ratas de modelo de enfermedad de Parkinson (PD) inducida por 6-hidroxidopamina (6-OHDA).

25 25 Sorprendentemente, los autores de la presente invención descubrieron que la fusión de dos o las tres enzimas de síntesis de dopamina da lugar a i) enzimas funcionales; y ii) una ruta biosintética de dopamina potenciada para algunas construcciones, produciendo niveles elevados de L-DOPA y/o producción de dopamina. En particular, se observó producción potenciada de dopamina para algunas construcciones en comparación con los niveles obtenidos usando la construcción con los tres genes que codifican las enzimas de síntesis de dopamina separadas por secuencias IRES. Contrario a lo esperado, para muchas construcciones, la mejora resultante de estos diseños de fusión no estaba asociada con un aumento en el título del vector, lo que indica que las secuencias IRES no estaban teniendo un efecto inhibidor sobre el título. Además, los niveles aumentados de L-DOPA y dopamina no se debían a aumentos en la expresión de proteínas a partir de los vectores de diseño de fusión, lo que sugiere que el diseño de fusión tenía una actividad específica mayor.

35 Descripción de las figuras

35 Figura 1 - Representación esquemática de genomas que codifican fusiones de enzimas de dopamina.

40 Figura 2 - Producción del vector a partir de pONYK-TAiC y producción de catecolamina a partir del vector integrado en células HEK293T

- a) resultados del ensayo de integración de ADN para evaluar el título del vector
- b) resultados del análisis de HPLC para evaluar la producción de catecolamina.

45 Figura 3 - Vector y producción de catecolamina

- a) resultados del ensayo de integración de ADN para evaluar el título del vector
- b) resultados del análisis de HPLC para evaluar la producción en células HEK293T.

50 Figura 4 - Detección de proteínas en la ruta dopaminérgica por análisis de transferencia de Western.

55 Figura 5 - Vector y producción de catecolamina a partir de cinco construcciones de fusión

- a) resultados del ensayo de integración de ADN para evaluar el título del vector
- b) resultados del análisis de HPLC para evaluar la producción de catecolamina en células HEK293T.

60 Figura 6 - Detección de proteínas en la ruta dopaminérgica por análisis de transferencia de Western

- a) análisis de transferencia de Western para examinar la expresión de TH
- b) análisis de transferencia de Western para examinar la expresión de CH1
- c) análisis de transferencia de Western para examinar la expresión de AADC.

65 Figura 7 - Diagrama que muestra la vinculación de una versión truncada de TH a AADC a través de un conector GS15.

Figura 8 - Detección de proteínas en la ruta dopaminérgica a partir de células HEK293T transducidas por análisis de transferencia de Western

- 5 a) análisis de transferencia de Western para examinar la expresión de TH
 b) análisis de transferencia de Western para examinar la expresión de CH1
 c) análisis de transferencia de Western para examinar la expresión de AADC.

* *El tamaño de banda corregido para TH fusionada a CH1 es 68 kDa y aunque pueden observarse bandas en estos carriles hay una banda no específica en todos los demás carriles en este tamaño. Sin embargo, las bandas son más oscuras en intensidad que las bandas no específicas.*

10 Figura 9 - Resultados del ensayo de integración de ADN para evaluar el título del vector de preparaciones de vector de fusión no concentrada y concentrada.

15 Figura 10 - Neuronas del cuerpo estriado transducidas con el vector EIAV a una MOI 1

- a) neuronas del cuerpo estriado transducidas por EIAV-GFP (MOI 1)
 b) producción de catecolamina a partir de neuronas del cuerpo estriado transducidas con el vector.

20 Figura 11 - Producción de vector a partir de TCiAmoD y producción de catecolamina a partir del vector integrado

- a) resultado del ensayo de integración de ADN para evaluar el título del vector
 b) resultado del análisis de HPLC para evaluar la producción de catecolamina a partir de células HEK293T.

25 Figura 12 - Transducción de neuronas corticales primarias humanas con la fusión pONYK1 y vectores de GFP

- a) imágenes de neuronas corticales primarias humanas transducidas con el vector EIAV-GFP a MOI 2 y 10
 b) producción de catecolamina a partir de neuronas corticales primarias humanas transducidas con el vector EIAV a MOI 0,4 (niveles de fondo de GFP sustraídos) - recolección 1 (5 días después de la transducción).

30 Figura 13 - Detección de enzimas de síntesis de dopamina a partir de neuronas corticales humanas transducidas por análisis de transferencia de Western

- 35 a) análisis de transferencia de Western para examinar la expresión de TH
 b) análisis de transferencia de Western para examinar la expresión de AADC.

Figura 14 - Gráfico que muestra los valores de clasificación clínica (máximo 14) después de la administración de vector estereotáctico en el día 1.

40 Figura 15 - Imágenes PET de un cerebro de macaco cangrejero en la medida inicial (medida inicial), después de lesión con MPTP (MPTP) y finalmente 3 meses después de la administración del vector OXB-102 (MPTP 3M PI). El animal se trató, en ocasiones diferentes, con radioindicadores ¹⁸F-FMT (18F-FMTyR) y ¹⁸F-Fallypride (18F-Fallypride).

45 Sumario de aspectos de la invención

Los autores de la presente invención han ensayado varias construcciones que comprenden las enzimas de síntesis de dopamina tirosina hidroxilasa (TH), GTP-ciclohidrolasa I (CH1), aminoácido aromático dopa descarboxilasa (AADC), que comprenden una fusión de al menos dos de los tres genes.

50 Como resultado de este estudio, han surgido dos temas claros:

- (i) construcciones que tienen TH unida a CH1 en ese orden (es decir, para formar una proteína de fusión de TH-CH1) dan niveles absolutos elevados de producción de catecolamina; y
 55 (ii) construcciones que tienen AADC y TH unidas en cualquier orden (es decir, para formar una proteína de fusión de AADC-TH o TH-AADC) dan una conversión muy eficaz de L-DOPA en dopamina. Las relaciones de dopamina:L-DOPA asociadas con dichas construcciones son elevadas.

60 La presente invención proporciona una construcción que comprende (i) una secuencia de nucleótidos que codifica tirosina hidroxilasa (TH), (ii) una secuencia de nucleótidos que codifica GTP-ciclohidrolasa I (CH1) y (iii) una secuencia de nucleótidos que codifica aminoácido aromático dopa descarboxilasa (AADC) donde la secuencia de nucleótidos que codifica TH está unida a la secuencia de nucleótidos que codifica CH1 de modo que codifican una proteína de fusión TH-CH1.

La construcción puede seleccionarse de las siguientes:

5 TH_L-CH1_{-IRES}-AADC;
 AADC_{-L}-TH_L-CH1;
 TH_L-CH1_{-L}-AADC; y
 TH_L-CH_P-AADC

10 L=secuencia codificante del conector
 IRES=sitio interno de entrada del ribosoma
 P=promotor

La construcción puede no comprender un IRES en dirección 5' de la secuencia codificante de TH-CH1 para iniciar la traducción de la proteína de fusión TH-CH1.

15 Se describe una construcción que comprende (i) una secuencia de nucleótidos que codifica la tirosina hidroxilasa (TH), (ii) una secuencia de nucleótidos que codifica la GTP-ciclohidrolasa I (CH1) y (iii) una secuencia de nucleótidos que codifica aminoácido aromático dopa descarboxilasa (AADC) donde la secuencia de nucleótidos que codifica AADC está unida de forma funcional a la secuencia de nucleótidos que codifica TH de modo que codifican una proteína de fusión AADC-TH o TH-AADC.

20 La construcción puede seleccionarse de las siguientes:

25 TH_L-AADC_{-IRES}-CH1
 AADC_{-L}-TH_{-IRES}-CH1
 AADC_{-L}-TH1_{-L}-CH1
 TH1_{-L}-AADC_{-L}-CH1

30 L=secuencia codificante del conector
 IRES=sitio interno de entrada del ribosoma

35 La construcción puede comprender un conector que no tiene codones optimizados para uso en seres humanos.

40 La construcción puede comprender un conector que comprende la secuencia mostrada como la SEQ ID No. 1 o la secuencia mostrada como la SEQ ID No. 3.

45 La construcción puede tener la secuencia AADC_{-L1}-TH_{-L2}-CH1 o TH_{-L1}-AADC_{-L2}-CH1 donde L1 y L2 son dos secuencias conectoras diferentes. La secuencia de ácido nucleico de L1 y L2 puede ser diferente, pero la secuencia de aminoácidos de L1 y L2 puede ser igual. Como alternativa, L1 y L2 pueden tener la misma secuencia de nucleótidos.

50 L1 y L2 pueden seleccionarse de SEQ ID No. 1 o SEQ ID No. 3

55 Cuando la construcción comprende un promotor, el promotor puede ser, por ejemplo, un promotor constitutivo o un promotor específico de tejido. Los ejemplos de promotores constitutivos incluyen el promotor de CMV, el promotor de la fosfoglicerato quinasa y el promotor de la timidina quinasa.

60 La presente invención proporciona un genoma de vector vírico que comprende una construcción de acuerdo con la presente invención.

65 El genoma del vector vírico puede ser, por ejemplo, un genoma de vector lentivírico o un genoma de vector de virus adenoasociado.

70 En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un sistema de vector vírico que comprende un genoma de acuerdo con el segundo aspecto de la invención.

75 El sistema de vector vírico puede ser, por ejemplo, un sistema de vector lentivírico o un sistema de vector de virus adenoasociado.

80 El sistema de vector lentivírico puede comprender:

85 (i) un genoma de acuerdo con el segundo aspecto de la invención;
 (ii) una secuencia o secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas gag y pol;
 (iii) secuencias de nucleótidos que codifican otros componentes esenciales de empaquetado del virus no codificado por la secuencia de nucleótidos de ii).

La presente invención proporciona un método para producir una partícula lentivírica, comprendiendo el método introducir en una célula productora:

- 5 i) un genoma de acuerdo con la presente invención,
ii) una secuencia o secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas gag y pol; y
iii) secuencias de nucleótidos que codifican otros componentes esenciales de empaquetado del virus no codificados por una o más de las secuencias de nucleótidos de ii).
- 10 La presente invención proporciona una partícula vírica producida por el sistema de la presente invención o por el método de la presente invención, que comprende NOI que codifican las enzimas de síntesis de dopamina GTP-ciclohidrolasa I (CH1), tirosina hidroxilasa (TH) y aminoácido aromático dopa descarboxilasa (AADC), al menos dos de las cuales están presentes como una proteína de fusión.
- 15 También se proporciona una partícula de vector vírico de acuerdo con la presente invención que es una partícula de vector EIAV y que se pseudotipa con VSV-G.
- La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una partícula vírica de acuerdo con la presente invención, junto con un vehículo o un diluyente farmacéuticamente aceptable.
- 20 Se describe un método para producir dopamina *in vivo*, que comprende la etapa de expresar las enzimas de síntesis de dopamina GTP-ciclohidrolasa I (CH1), tirosina hidroxilasa (TH) y aminoácido aromático dopa descarboxilasa (AADC) en el sujeto a partir de una construcción descrita en este documento.
- 25 También se describe un método para tratar y/o prevenir una enfermedad neurodegenerativa o una enfermedad donde los niveles de dopamina están reducidos en un sujeto, que comprende la etapa de administrar una partícula vírica descrita en este documento o una composición farmacéutica descrita en este documento al sujeto.
- 30 Se describe una partícula vírica o una composición farmacéutica descrita en este documento para su uso en el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad neurodegenerativa en un sujeto, induciendo síntesis de dopamina *in vivo*.
- La enfermedad neurodegenerativa puede ser enfermedad de Parkinson. La enfermedad en la que los niveles de dopamina están reducidos puede ser síndrome de Lesch-Nyhan.
- 35 Se describe una secuencia de nucleótidos que codifica un conector que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada como la SEQ ID No. 2, pero cuya secuencia de nucleótidos tiene una secuencia diferente a la mostrada en la SEQ ID No. 3.
- 40 La secuencia de nucleótidos puede carecer del par de codones GGA GGC.
- 45 CONSTRUCCIÓN
- 45 Se describe una construcción.
- 50 La secuencia de nucleótidos comprende tres secuencias de nucleótidos de interés (NOI), cada una de las cuales codifica una actividad enzimática.
- 55 La construcción puede ser una secuencia de ADN o de ARN, tal como por ejemplo una secuencia sintética de ARN/ADN, una secuencia recombinante de ARN/ADN (es decir, preparada por el uso de técnicas de ADN recombinante), una secuencia de ADNc o una secuencia parcial de ADN genómico, incluyendo combinaciones de las mismas.
- 60 NOI
- 60 Se describen vectores, tales como plásmidos, que comprenden la construcción descrita en este documento.
- 65 Cada NOI en la construcción codifica una enzima implicada en la síntesis de dopamina. Las NOI codifican la tirosina hidroxilasa (TH), GTP-ciclohidrolasa I (CH1) y aminoácido aromático dopa descarboxilasa (AADC).
- 65 Están disponibles las secuencias de las tres enzimas: números de acceso X05290, U19523 y M76180, respectivamente.

La NOI puede codificar todo o parte de la enzima de síntesis de dopamina. Por ejemplo, la NOI puede codificar una versión truncada de la proteína que retiene la actividad enzimática.

5 La TH de longitud completa comprende un dominio catalítico, un dominio de tetramerización y un dominio regulador N-terminal. La NOI que codifica TH del vector descrito en este documento puede codificar una TH truncada que contiene el dominio catalítico y de tetramerización, pero carece de un dominio regulador N-terminal funcional.

10 Esta forma de TH evita la inhibición por retroalimentación de dopamina que puede limitar la actividad de la enzima de longitud completa.

10 La NOI puede codificar un mutante, homólogo o variante de la enzima de síntesis de dopamina.

15 El término "mutante" incluye enzimas que incluyen una o más variaciones de aminoácidos a partir de la secuencia de tipo silvestre. Por ejemplo, un mutante puede comprender una o más adiciones, delecciones o sustituciones de aminoácidos. Un mutante puede surgir de forma natural o puede crearse de forma artificial (por ejemplo, por mutagénesis dirigida al sitio).

20 Aquí, el término "homólogo" significa una proteína que tiene una cierta homología con la enzima de síntesis de dopamina. Aquí, el término "homología" puede equipararse a "identidad".

25 20 En el presente contexto, una secuencia homóloga puede ser al menos un 75, 85 o un 90 % idéntica o al menos un 95 o un 98 % idéntica a la presente secuencia a nivel de aminoácidos o de nucleótidos. Típicamente, los homólogos comprenderán o codificarán los mismos sitios activos, etc. que la presente secuencia. Las comparaciones de identidad pueden realizarse, por ejemplo, usando el software BLAST.

25 La NOI puede tener los codones optimizados.

CONECTORES

30 30 El genoma del vector lentivírico descrito en este documento comprende tres NOI que codifican las enzimas de síntesis de dopamina. Al menos dos de las NOI están unidas por una secuencia codificante de conector (L), de modo que el genoma codifique una proteína de fusión que comprende las secuencias de aminoácidos de la enzima.

35 35 Un conector adecuado puede comprender repeticiones de aminoácidos tales como repeticiones de glicina-serina. El propósito del conector es permitir la correcta formación y/o el funcionamiento de las enzimas. Debe ser suficientemente flexible y suficientemente largo para conseguir ese propósito. Como las NOI codifican diferentes enzimas, el conector tiene que elegirse para permitir el funcionamiento de ambas enzimas. La secuencia codificante del conector flexible puede elegirse de modo que fomente la pausa traduccional y, por lo tanto, el plegamiento independiente de los productos proteicos de las NOI.

40 40 Un experto en la materia será capaz de diseñar secuencias codificantes de conector adecuadas para su uso en la secuencia de nucleótidos de la invención. Se dan a continuación algunos ejemplos específicos de conectores adecuados, pero la invención no está limitada a estos conectores particulares.

- 45 1. (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃ como se describe en Somia et al., 1993 PNAS 90, 7889.
 2. (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₅.
 3. (Asn-Phe-Ile-Arg-Gly-Arg-Glu-Asp-Leu-Leu-Glu-Lys-Ile-Ile-Arg-Gln-Lys-Gly-Ser-Ser-Asn) de HSF-1 de levadura, véase Wiederrecht et al., 1988 Cell 54, 841.
 4. (Asn-Leu-Ser-Ser-Asp-Ser-Ser-Leu-Ser-Pro-Ser-Ala-Leu-Asn-Ser-Pro-Gly-Ile-Glu-Gly-Leu-Ser) de OCT-1 específica de POU, véase Dekker et al., 1993 Nature 362, 852 y Sturm et al., 1988 Genes and Dev. 2,1582.
 5. (Gln-Gly-Ala-Thr-Phe-Ala-Leu-Arg-Gly-Asp-Asn-Pro-GlnGly) del péptido de laminina que contiene RGD, véase Aumailly et al., 1990 FEES Lett.262, 82.
 6. (Ser-Gly-Gly-Gly-Glu-Ile-Leu-Asp-Val-Pro-Ser-Thr-Gly-Gly-Ser-Ser-Pro-Gly) del conector que contiene LDV, véase Wickham et al., Gene Therapy 1995 2, 750.

55 55 Puede usarse el siguiente conector flexible GS15: (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃. También pueden ser adecuados los conectores GS5, GS15 y GS30.

60 60 En construcciones que comprenden dos conectores, es decir, las tres enzimas están unidas para expresarse como una proteína de fusión, pueden elegirse dos secuencias codificantes de conector no idénticas, como alternativa las secuencias conectoras pueden ser idénticas. Las secuencias conectoras pueden ser idénticas a nivel de aminoácidos, pero sus secuencias codificantes de ácido nucleico pueden ser diferentes debido a la degeneración del código genético.

Como se muestra en los ejemplos a continuación, el uso de una secuencia codificante de conector GS15 modificada (GS15mod) entre los genes de TH y CH1 produjo un aumento en la producción de catecolamina con ambas construcciones a pesar de la ausencia de evidencias de un aumento en la expresión de proteína.

5 La secuencia codificante de conector usada en la secuencia de nucleótidos de la presente invención puede ser una forma modificada de una secuencia codificante de conector, tal como una que codifica GS5, GS15 y GS30, que no tiene los codones optimizados para su uso en seres humanos.

La secuencia codificante de conector puede comprender la siguiente secuencia:

10 GGAGGTGGCGGGTCCGGGGCGGGGGTAGCGGTGGCGGGGCTCC (SEQ ID No. 1).

15 Se describe una secuencia de nucleótidos que codifica un conector que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada como la SEQ ID No. 2, pero cuya secuencia de nucleótidos tiene una secuencia diferente a la mostrada en la SEQ ID No. 3.

(Gly-Gly-Gly-Ser)₃ (SEQ ID No. 2).

20 GGGGGAGGCAGTAGCGGCGGAGGGGGCTCCGGCGGAGGGCGGGAGC (SEQ ID No. 3).

25 La construcción puede comprender la secuencia mostrada como la SEQ ID No. 1 (anterior).

IRES

30 Cuando está localizado entre fases de lectura abierta en un ARNm, un IRES permite la traducción de la fase de lectura abierta en dirección 3' promoviendo la entrada del ribosoma en el elemento IRES, seguido por inicio en dirección 3' de la traducción. Se ha investigado el uso de elementos IRES en vectores retrovíricos (véase, por ejemplo, el documento WO 93/0314). Las secuencias IRES adecuadas para su uso en vectores lentivíricos se describen en el documento WO 02/29065.

PROMOTOR

35 Un IRES puede remplazarse con un promotor, especialmente para controlar la expresión del gen de AADC. En configuraciones en las que la expresión de AADC está bajo el control de un IRES, los niveles de AADC pueden limitar la producción de dopamina.

40 La expresión de una NOI puede controlarse usando secuencias de control, que incluyen promotor/potenciadores y otras señales de regulación de la expresión. Pueden usarse promotores procariotas y promotores funcionales en células eucariotas. Pueden usarse promotores específicos de tejido o específicos de estímulo. También pueden usarse promotores químicos que comprenden elementos de secuencia de dos o más promotores diferentes.

45 Las secuencias promotoras adecuadas son promotores fuertes que incluyen los derivados de los genomas de virus - tales como poliomavirus, adenovirus, virus de la viruela, virus del papiloma bobino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus (CMV), retrovirus y virus de simio 40 (SV40) - o de promotores celulares de mamífero - tales como el promotor de la actina o el promotor de la proteína ribosómica. La transcripción de un gen puede aumentarse adicionalmente insertando una secuencia potenciadora en el vector. Los potenciadores son relativamente independientes de la orientación y de la posición; sin embargo, se puede emplear un potenciador de un virus de célula eucariota - tal como el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100-270) y el potenciador del promotor temprano de CMV. El potenciador puede cortarse y empalmarse en el vector en una posición 5' o 3' al promotor, pero preferiblemente se localiza en un sitio 5' del promotor.

50 El promotor puede incluir adicionalmente elementos para asegurar o aumentar la expresión en un hospedador adecuado. Por ejemplo, los elementos pueden ser regiones conservadas, por ejemplo, una caja Pribnow Box o una caja TATA. El promotor puede incluso contener otras secuencias que afectan (tal como mantienen, potencian, disminuyen) los niveles de expresión de una secuencia de nucleótidos. Las otras secuencias adecuadas incluyen el intrón Sh1 o un intrón ADH. Otras secuencias incluyen elementos inducibles - tales como elementos inducibles por temperatura, agentes químicos, luz o estrés. Además, puede haber elementos adecuados para potenciar la transcripción o la traducción presentes.

55 60 El promotor puede ser, por ejemplo, constitutivo o específico de tejido.

PROMOTOR CONSTITUTIVO

65 Los ejemplos de promotores constitutivos adecuados incluyen el promotor de CMV, el promotor de RSV, los promotores de fosfoglicerato quinasa (PGK) y timidina quinasa (TK).

PROMOTOR ESPECÍFICO DE TEJIDO

Los ejemplos de promotores específicos de tejido adecuados incluyen Sinapsina 1, Enolasa, proteína quinasa II dependiente de α -calcio/calmodulina y GFAP.

5 FUSIONES

La construcción de la presente invención comprende NOI que codifican TH, AADC y CH1. Dos de las tres, o las tres 10 enzimas pueden fusionarse, por ejemplo, usando un conector flexible. Cuando se fusionan dos enzimas, la NOI que codifica la tercera enzima puede estar unida de forma funcional a la secuencia de nucleótidos que codifica la 15 proteína de fusión por, por ejemplo, un IRES. El IRES puede estar situado 5' o 3' a la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de fusión. Como alternativa, la NOI que codifica la tercera enzima puede estar unida de forma funcional a un promotor.

15 Los autores de la presente invención han descubierto que:

- (i) construcciones que tienen TH ligada a CH1 en ese orden (es decir, para formar una proteína de fusión TH-CH1) dan altos niveles absolutos de producción de catecolamina; y
 20 (ii) construcciones que tienen AADC y TH ligadas en cualquier orden (es decir, para formar una proteína de fusión AADC-TH o TH-AADC) dan conversión altamente eficaz de L-DOPA en dopamina.

Es importante considerar la cantidad de proteína (es decir, enzimas) producida con cada construcción. Para algunas 25 construcciones, los niveles absolutos de proteína producidos eran bajos, pero los niveles de L-DOPA y/o dopamina eran relativamente altos. Esto indica que la eficacia de las enzimas en esa configuración particular es alta, a causa de una cantidad inferior de enzimas que está dando lugar a cantidades comparables de L-DOPA/dopamina.

30 La tabla 1 muestra la producción total de catecolamina para cada construcción después de transducción de células neuronales. Las construcciones se clasifican de acuerdo con la producción total de catecolamina. La producción de catecolamina para pONYK1 en el mismo experimento se muestra entre paréntesis.

Construcción	Producción de catecolamina (ng/ml)	Tipo de célula neuronal	Figura
TCIA	80,1 (0,5)	Neuronas del cuerpo estriado de rata	10b
ATCmod	25,6 (0,5)	Neuronas del cuerpo estriado de rata	10b
TCtkA	25,5 (0,6)	Neuronas de corteza primaria (humana)	12b
CTIA	10,8 (0,5)	Neuronas del cuerpo estriado de rata	10b
ATC	8,6 (0,5)	Neuronas del cuerpo estriado de rata	10b
TCiAmmod	5,6 (0,6)	Neuronas de corteza primaria (humana)	12b
TAiC	5,2 (0,5)	Neuronas del cuerpo estriado de rata	10b
TACmod	2,9 (0,6)	Neurona de corteza primaria (humana)	12b
TCAmod	2 (0,5)	Neuronas del cuerpo estriado de rata	10b
TCA	1,6 (0,5)	Neuronas del cuerpo estriado de rata	10b
ATiC	0,7 (0,5)	Neuronas del cuerpo estriado de rata	10b

35 La tabla 2 muestra la relación de dopamina:L-DOPA para cada construcción después de transducción de células neuronales. Las construcciones se clasificaron de acuerdo con la relación de dopamina:L-DOPA. La relación de dopamina:L-DOPA para pONYK1 en el mismo experimento se muestra entre paréntesis.

Construcción	Relación dopamina:L-DOPA	Células neuronales	Figura
TACmod	28 (-)*	Neuronas de corteza primaria (humana)	12b
ATCmod	5,2 (0,7)	Neuronas del cuerpo estriado de rata	10b
ATC	3,5 (0,7)	Neuronas del cuerpo estriado de rata	10b
TCiAmmod	2,7 (-)*	Neuronas de corteza primaria (humana)	12b
TAiC	1,7 (0,7)	Neuronas del cuerpo estriado de rata	10b
ATiC	1,3 (0,7)	Neuronas del cuerpo estriado de rata	10b
TCAmod	1 (0,7)	Neuronas del cuerpo estriado de rata	10b
TCA	0,5 (0,7)	Neuronas del cuerpo estriado de rata	10b
TCIA	0,1 (0,7)	Neuronas del cuerpo estriado de rata	10b
CTIA	0,01 (0,7)	Neuronas del cuerpo estriado de rata	10b
TCtkA	0,01 (-)*	Neuronas de corteza primaria (humana)	12b

* L-DOPA no detectable para pONYK1 después de la corrección para los niveles de fondo

La construcción CTIA no muestra rendimiento mejorado.

Sin el deseo de limitarse a teoría alguna, los autores de la presente invención consideran que la razón por la que TCiA mostrara rendimiento mejorado, pero CTiA no es porque el orden de las enzimas en la fusión de TC es importante. La construcción descrita en este documento, por lo tanto, puede codificar una fusión de TH y CH1 en el orden TC, en lugar de CT.

- 5 La construcción puede seleccionarse de las siguientes:
- 10 TH_L-CH_L-IRES-AADC;
AADC-L-TH_L-CH1;
TH_L-CH1-L-AADC; y
TH_L-CH1_P-AADC
TH_L-AADC-IRES-CH1
AADC-L-TH-IRES-CH1
TH1-L-AADC-L-CH1
- 15 L = secuencia codificante del conector
IRES = sitio interno de entrada del ribosoma
P = promotor
- 20 Como se menciona anteriormente, TH comprende un dominio catalítico, un dominio de tetramerización y un dominio regulador N-terminal.
- 25 La NOI que codifica TH puede codificar una TH truncada que contiene el dominio catalítico y de tetramerización, pero que carece de un dominio regulador N-terminal funcional.
- 30 La figura 7 muestra la secuencia de una construcción en que el extremo C-terminal de una versión truncada de TH está fusionada a través de un conector GS15 al extremo N-terminal de AADC.
- Como alternativa, la CH1 puede fusionarse a través de su extremo N-terminal dejando su extremo C-terminal libre.
- 35 VECTORES VÍRICOS
- La presente invención también proporciona un genoma de vector vírico, tal como un genoma de vector lentivírico o un genoma de vector de virus adenoasociado que comprende una secuencia de nucleótidos de acuerdo con la presente invención. También se describe un sistema de producción de vector vírico y partícula de vector que comprende dicho genoma.
- 40 El vector vírico descrito en este documento puede derivar o puede ser derivable de cualquier virus adecuado. Una partícula vírica recombinante es capaz de transducir una célula diana con una secuencia de nucleótidos de interés (NOI).
- Para una partícula retrovírica, una vez dentro de la célula, el genoma de ARN de la partícula de vector se transcribe de forma inversa en ADN y se integra en el genoma de la célula diana.
- 45 VECTORES LENTIVÍRICOS
- Los lentivirus son parte de un grupo más grande de retrovirus. Puede encontrarse una lista detallada de lentivirus en Coffin et al., (1997) "Retroviruses" Cold Spring Harbor Laboratory Press Eds: JM Coffin, SM Hughes, HE Varmus pág. 758-763). En resumen, los lentivirus pueden dividirse en los grupos de primates y no de primates. Los ejemplos de lentivirus de primates incluyen, aunque sin limitación: el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el agente causante del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y el virus de la inmunodeficiencia del simio (VIS). El grupo de lentivirus no de primates incluye el virus visna/maedi (VMV) prototípico "de virus lento", así como el virus de la artritis-encefalitis caprina (CAEV) relacionado, el virus de la anemia infecciosa equina (EIAV), el virus de la inmunodeficiencia felina (VIF) y el virus de la inmunodeficiencia bovina (VIB).
- 55 Los lentivirus difieren de otros miembros de la familia de retrovirus porque los lentivirus tienen la capacidad de infectar células tanto en división como células que no están en división (Lewis et al., (1992) EMBO J 11(8):3053-3058) y Lewis y Emerman (1994) J Virol 68 (1):510-516). En contraste, otros retrovirus - tales como MLV - son incapaces de infectar células que no están en división o que se dividen lentamente tales como las que componen, por ejemplo, el músculo, el ojo, el cerebro, el pulmón y el tejido hepático.
- 60 Un vector lentivírico, como se usa en este documento, es un vector que comprende al menos una parte componente derivable de un lentivirus. Preferiblemente, esa parte componente está implicada en los mecanismos biológicos por los que el vector infecta las células, expresa los genes o se replica.

- La estructura básica de los genomas de retrovirus y de lentivirus comparte muchas características comunes tales como una 5' LTR y una 3' LTR, entre o dentro de las que están localizadas una señal de empaquetado para posibilitar que el genoma se empaquete, un sitio de unión al cebador, sitios de adhesión para posibilitar la integración en un genoma de célula hospedadora y los genes *gag*, *pol* y *env* que codifican los componentes de empaquetado - estos son polipéptidos necesarios para el ensamblaje de las partículas víricas. Los lentivirus tienen 5 características adicionales, tales como las secuencias *rev* y RRE en VIH, que posibilitan la exportación eficaz de transcritos de ARN del provirus integrado desde el núcleo hasta el citoplasma de una célula diana infectada.
- En el provirus, los genes víricos están flanqueados en ambos extremos por regiones llamadas repeticiones terminales largas (LTR). Las LTR son responsables de la transcripción, sirviendo como secuencias potenciadoras-promotoras y señales de poliadenilación, controlando de ese modo la expresión de los genes víricos. 10
- Las propias LTR son secuencias idénticas que pueden dividirse entre elementos, que se llaman U3, R y U5. U3 deriva de la secuencia única al extremo 3' del ARN. R deriva de una secuencia repetida en ambos extremos del ARN y U5 deriva de la secuencia única al extremo 5' del ARN. Los tamaños de los tres elementos pueden variar considerablemente entre diferentes virus. 15
- En un genoma de vector lentivírico de replicación defectuosa pueden estar ausentes *gag*, *pol* y *env* o no ser funcionales. 20
- En un vector lentivírico típico descrito en este documento, al menos parte de una o más regiones codificantes de proteína esenciales para la replicación pueden eliminarse del virus. Esto hace que el vector vírico sea de replicación defectuosa. Las partes del genoma vírico también pueden remplazarse por una NOI para generar un vector que comprende una NOI que es capaz de transducir una célula hospedadora que no está en división diana y/o integrar su genoma en un genoma hospedador. 25
- Los vectores lentivíricos descritos en este documento pueden ser vectores que no se integran como se describe en el documento WO 2007/071994. 30
- Los vectores pueden tener la capacidad de suministrar una secuencia que está desprovista o que carece de ARN vírico. Un dominio de unión heterólogo (heterólogo a *gag*) puede estar localizado en el ARN a suministrar y puede usarse un dominio de unión equivalente en *gag* o en *pol* para asegurar el empaquetado del ARN a suministrar. Estos dos vectores se describen en el documento WO 2007/072056.
- El vector lentivírico puede ser un vector "que no es de primates", es decir, derivado de un virus que no infecta principalmente a primates, especialmente a seres humanos. 35
- El vector vírico puede derivar de EIAV. Además de los genes *gag*, *pol* y *env*, EIAV codifica otros tres genes: *tat*, *rev* y *S2*. *Tat* actúa como activador de la transcripción de la LTR vírica (Derse y Newbold (1993) *Virology* 194(2):530-536 y 40 Maury et al., (1994) *Virology* 200(2):632-642) y *Rev* regula y coordina la expresión de genes víricos a través de elementos de respuesta a *rev* (RRE) (Martarano et al., (1994) *J Virol* 68(5):3102-3111). Se cree que los mecanismos de acción de estas dos proteínas son ampliamente similares a los mecanismos análogos en los virus de primate (Martarano et al., (1994) *J Virol* 68(5):3102-3111). La función de *S2* es desconocida. Además, se ha identificado que una proteína de EIAV, *Ttm*, está codificada por el primer exón de *tat* con corte y empalme a la secuencia codificante de *env* en el inicio de la proteína transmembrana (Beisel et al., (1993) *J Virol* 67(2):832-842). 45
- La expresión "vector lentivírico recombinante" se refiere a un vector con suficiente información genética lentivírica para permitir el empaquetado de un genoma de ARN, en presencia de componentes de empaquetado, en una partícula vírica capaz de infectar una célula diana. La infección de la célula diana puede incluir la transcripción inversa y la integración en el genoma de la célula diana. El vector lentivírico recombinante porta secuencias codificante no víricas que tienen que suministrarse por el vector a la célula diana. Un vector lentivírico recombinante no tiene capacidad de replicación independiente para producir partículas lentivíricas infecciosas dentro de la célula diana final. Habitualmente, el vector lentivírico recombinante carece de un gen *gag-pol* y/o *env* funcional y/u otros genes esenciales para la replicación. El vector descrito en este documento puede configurarse como un vector de intrones divididos. Un vector de intrones divididos se describe en la solicitud de patente PCT WO 99/15683. 50
- El vector lentivírico recombinante descrito en este documento puede tener un genoma vírico mínimo. 55
- Como se usa en este documento, la expresión "genoma vírico mínimo" significa que el vector vírico se ha manipulado para eliminar los elementos no esenciales y para retener los elementos esenciales para proporcionar la funcionalidad requerida para infectar, transducir y suministrar una secuencia de nucleótidos de interés a una célula hospedadora diana. Pueden encontrarse detalles adicionales de esta estrategia en nuestro documento WO 98/17815. 60
- El vector descrito en este documento puede ser un vector de auto-inactivación. 65

- A modo de ejemplo, se han construido vectores retrovíricos de auto-inactivación delecionando los potenciadores transcripcionales o los potenciadores y el promotor en la región U3 de la 3' LTR. Después de una ronda de transcripción inversa del vector e integración, estos cambios se copian tanto en la 5' LTR como en la 3' LTR, produciendo un provirus transcripcionalmente inactivo (Yu et al., (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. 83:3194-3198; 5 Dougherty y Temin et al., (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. 84:1197-1201; Hawley (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. 84:2406-2410 y Yee et al., (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. 84:9564-9568). Sin embargo, cualquier promotor o promotores internos a las LTR en dichos vectores aún serían transcripcionalmente activos. Esta estrategia se ha empleado para 10 eliminar los efectos de los potenciadores y los promotores en las LTR víricas en transcripción a partir de genes colocados de forma interna. Dichos efectos incluyen transcripción aumentada (Jolly et al., (1983) Nucleic Acids Res. 11:1855-1872) o supresión de la transcripción (Emerman y Temin (1984) Cell 39:449-467). Esta estrategia también 15 puede usarse para eliminar la transcripción en dirección 3' desde la 3' LTR en el ADN genómico (Herman y Coffin (1987) Science 236:845-848). Esto es de particular preocupación en terapia génica humana donde es de importancia crítica evitar la activación accidental de un oncogén endógeno.
- 15 Sin embargo, el vector plasmídico usado para producir el genoma vírico dentro de la célula hospedadora/célula de empaquetado también incluirá secuencias de control reguladoras de la transcripción unidas de forma funcional al genoma lentivírico para dirigir la transcripción del genoma en una célula hospedadora/célula de empaquetado. Estas 20 secuencias reguladoras pueden ser las secuencias naturales asociadas con la secuencia lentivírica transcrita, es decir, la región 5' U3 o pueden ser un promotor heterólogo tal como otro promotor vírico, por ejemplo, el promotor CMV. Algunos genomas lentivíricos requieren secuencias adicionales para una producción eficaz del virus. Por 25 ejemplo, en el caso del VIH, la secuencia rev y RRE se incluye preferiblemente. Sin embargo, el requisito de rev y RRE puede reducirse o eliminarse por optimización de codones de gag-pol (como se describe en el documento WO 01/79518) y/o la inclusión de una fase de lectura abierta en dirección 3' de la LTR y en dirección 5' del promotor interno (como se describe en el documento WO 03/064665), por ejemplo, se ha usado neo en las construcciones 30 mostradas en la figura 1, sin embargo, los expertos en la materia podrían usar cualquier fase de lectura abierta adecuada. También se conocen secuencias alternativas que realizan la misma función que el sistema rev/RRE. Por ejemplo, se encuentra un análogo funcional del sistema rev/RRE en el virus de mono Mason Pfizer. Este se conoce como el elemento de transporte constitutivo (CTE) y comprende una secuencia de tipo RRE en el genoma que se cree que interactúa con un factor en la célula infectada. El factor celular puede considerarse un análogo de rev. Por tanto, CTE puede usarse como alternativa al sistema rev/RRE. Cualquier otro equivalente funcional que se conozca o llegue a estar disponible puede ser relevante para la invención. Por ejemplo, también se sabe que la proteína Rex de HTLV-I puede remplazar de forma funcional la proteína Rev del VIH-1. También se sabe que Rev y Rex tienen efectos similares a IRE-BP.
- 35 El vector lentivírico descrito en este documento puede consistir en un vector lentivírico mínimo de auto-inactivación, derivado del virus de la anemia infecciosa equina (EIAV), que codifica preferiblemente tres enzimas que están implicadas en la ruta sintética de dopamina. Las proteínas codificadas por dicho vector pueden comprender una forma truncada del gen humano de la tirosina hidroxilasa (que carece de los 160 aminoácidos N-terminales implicados en la regulación por retroalimentación de TH), la L-aminoácido aromático descarboxilasa (AADC) humana 40 y el gen humano de la GTP-ciclohidrolasa 1 (GTP-CH1). El vector puede producirse por transfección transitoria de las células (por ejemplo, células HEK293T) con tres plásmidos, que codifican: (1) los genomas del vector como se describe en este documento, (2) el vector de expresión sintético de gag/pol de EIAV (pESGPK, documento WO 01/79518 y documento WO 05/29065) y (3) el vector de expresión de la envuelta VSV-G (pHGK).
- 45 Secuencia de empaquetado
- 50 La expresión "señal de empaquetado" que se menciona de forma equivalente a "secuencia de empaquetado" o "psi" se usa en referencia a la secuencia no codificante de acción en cis necesaria para la encapsidación de las hebras de ARN del lentivirus durante la formación de la partícula vírica. En el VHI-1, esta secuencia se ha localizado en los 55 locus que se extienden desde un punto en dirección 5' del sitio principal donante de corte y empalme (SD) hasta al menos el codón de inicio de gag.
- Como se usa en este documento, la expresión "señal prolongada de empaquetado" o "secuencia prolongada de empaquetado" se refiere al uso de secuencias alrededor de la secuencia psi con prolongación adicional en el gen gag. La inclusión de estas secuencias adicionales de empaquetado puede aumentar la eficacia de la inserción del ARN del vector en las partículas víricas.
- Pseudotipado
- 60 El vector lentivírico descrito en este documento puede pseudotiparse. A este respecto, el pseudotipado puede conferir una o más ventajas. Por ejemplo, con los vectores lentivíricos, el producto génico env de los vectores basados en VIH restringirían estos vectores a infectar solamente células que expresan una proteína llamada CD4. Pero si el gen env en estos vectores se ha sustituido con secuencias env de otros virus, entonces podrían tener un 65 espectro infeccioso más amplio (Verma y Somia (1997) Nature 389(6648):239-242). A modo de ejemplos, Miller et al., pseudotiparon un vector MoMLV con la envuelta del retrovirus anfotérico 4070A (Mol. Cell. Biol. 5:431-437), otros

colaboradores han pseudotipado un vector lentivírico basado en VIH con la glucoproteína de VSV (Verma y Somia (1997) *Nature* 389(6648):239-242).

En otra alternativa, la proteína Env puede ser una proteína Env modificada tal como una proteína Env mutante o diseñada por ingeniería. Las modificaciones pueden hacerse o seleccionarse para introducir capacidad de dirección o para reducir la toxicidad o con otro fin (Marin et al., (1996) *J Virol* 70(5):2957-2962; Nilson et al., (1996) *Gene Ther* 3(4):280-286; y Fielding et al (1998) *Blood* 91(5):1802-1809 y referencias citadas en los mismos).

El vector puede pseudotiparse, por ejemplo, con un gen que codifica al menos parte de la proteína G de la rabia o la proteína VSV-G.

VSV-G

La glucoproteína de envuelta (G) del virus de la estomatitis vesicular (VSV), un rhabdovirus, es una proteína de envuelta que ha demostrado ser capaz de pseudotipar ciertos retrovirus incluyendo los lentivirus.

Su capacidad de pseudotipar vectores retrovíricos basados en MoMLV en ausencia de cualquier proteína de envuelta retrovírica se demostró por primera vez por Emi et al., (1991) *J. Virol.* 65:1202-1207). El documento WO 94/294440 muestra que los vectores retrovíricos pueden pseudotiparse satisfactoriamente con VSV-G. Estos vectores VSV-G pseudotipados pueden usarse para transducir una amplia gama de células de mamífero. Más recientemente, Abe et al., (1998) *J. Virol.* 72(8): 6356-6361 mostraron que partículas retrovíricas no infecciosas pueden hacerse infecciosas por la adición de VSV-G.

Burns et al., (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:8033-8037 pseudotiparon satisfactoriamente el retrovirus MLV con VSV-G y esto produjo un vector que tiene un rango de hospedador alterado en comparación con MLV en su forma nativa. Los vectores pseudotipados con VSV-G han demostrado infectar no solamente células de mamífero, sino también líneas celulares derivadas de peces, reptiles e insectos (Burns et al., (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:8033-8037). También han demostrado ser más eficaces que las envueltas anfotéricas tradicionales para una diversidad de líneas celulares (Yee et al., (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:9564-9568 y Emi et al., (1991) *J. Virol.* 65:1202-1207). La proteína VSV-G también puede usarse para pseudotipar ciertos lentivirus y retrovirus porque su cola citoplasmática es capaz de interactuar con los núcleos retrovíricos.

Proporcionar una envuelta de pseudotipado no lentivírica tal como una proteína VSV-G da la ventaja de que las partículas del vector pueden concentrarse en un alto título sin pérdida de infectividad (Akkina et al., (1996) *J. Virol.* 70:2581-2585). Las proteínas de envuelta de lentivirus y de retrovirus son aparentemente incapaces de resistir las fuerzas de corte durante la ultracentrifugación, probablemente porque consisten en dos subunidades unidas no covalentemente. La interacción entre las subunidades puede alterarse por la centrifugación. En comparación, la glucoproteína de VSV está compuesta de una única unidad. El pseudotipado de la proteína VSV-G, por lo tanto, puede ofrecer ventajas potenciales.

El documento WO 00/52188 describe la generación de vectores retrovíricos y lentivíricos pseudotipados, a partir de líneas celulares productoras estables, que tienen la proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G) como la proteína de envuelta vírica asociada a membrana, y proporciona una secuencia génica para la proteína VSV-G.

45 Virus del rio Ross

La envuelta del virus del rio Ross se ha usado para pseudotipar un vector lentivírico que no es de primates (VIF) y después de administración sistémica transdujo predominantemente el hígado (Kang et al., (2002) *J. Virol.* 76(18):9378-9388.). Se presentó que la eficacia era 20 veces mayor que la obtenida con el vector pseudotipado de VSV-G, y causaba menos citotoxicidad que la medida por los niveles séricos de enzimas hepáticas que sugieren hepatotoxicidad.

El virus del rio Ross (RRV) es un alfavírus propagado por los mosquitos, que es endémico y epidémico en regiones tropicales y templadas de Australia. Las tasas de anticuerpos en poblaciones normales en las zonas costeras templadas tienden a ser bajas (del 6 % al 15 %) aunque la sero-prevalencia alcanza de un 27 a un 37 % en las llanuras del sistema del valle del río Murray. De 1979 a 1980 el virus del río Ross se volvió epidémico en las islas del Pacífico. La enfermedad no es contagiosa entre seres humanos y nunca es mortal, siendo el primer síntoma el dolor articular con fatiga y apatía en aproximadamente la mitad de los pacientes (Fields Virology quinta edición (2007) Eds. Knipe y Howley. Lippincott Williams and Wilkins).

60 GP64 de baculovirus

La proteína GP64 de baculovirus ha demostrado ser una alternativa atractiva a VSV-G para vectores víricos usados en la producción a gran escala de virus de alto título necesario para aplicaciones clínicas y comerciales (Kumar M, Bradow BP, Zimmerberg J (2003) *Hum. Gene Ther.* 14(1):67-77). En comparación con los vectores pseudotipados con VSV-G, los vectores pseudotipados con GP64 tienen un amplio tropismo similar y títulos nativos similares. Como

la expresión de GP64 no elimina las células, pueden generarse líneas celulares basadas en 293T que expresan de forma constitutiva GP64.

G de la rabia

5 El vector descrito en este documento puede pseudotiparse con al menos una parte de la proteína G de la rabia o un mutante, variante, homólogo o fragmento de la misma.

10 Los contenidos sobre la proteína G de la rabia, así como los mutantes de la misma, pueden encontrarse en el documento WO 99/61639 y también en Rose et al., (1982) J. Virol. 43:361-364, Hanham et al., (1993) J. Virol. 67:530-542; Tuffereau et al., (1998) J. Virol. 72:1085-1091, Kucera et al., (1985) J. Virol. 55:158-162; Dietzschold et al., (1983) PNAS 80:70-74; Seif et al., (1985) J. Virol. 53:926-934; Coulon et al., (1998) J. Virol. 72:273-278; Tuffereau et al., (1998) J. Virol. 72:1085-10910; Burger et al., (1991) J. Gen. Virol. 72:359-367; Gaudin et al., (1995) J. Virol. 69:5528-5534; Benmansour et al., (1991) J. Virol. 65:4198-4203; Luo et al., (1998) Microbiol. Immunol. 42:187-193, Coll (1997) Arch. Virol. 142:2089-2097; Luo et al., (1997) Virus Res. 51:35-41; Luo et al., (1998) Microbiol. Immunol. 42:187-193; Coll (1995) Arch. Virol. 140:827-851; Tuchiya et al., (1992) Virus Res. 25:1-13; Morimoto et al., (1992) Virology 189:203-216; Gaudin et al., (1992) Virology 187:627-632; Whitt et al., (1991) Virology 185:681-688; Dietzschold et al., (1978) J. Gen. Virol. 40:131-139; Dietzschold et al., (1978) Dev. Biol. Stand. 40:45-55; Dietzschold et al., (1977) J. Virol. 23:286-293 y Otvos et al., (1994) Biochim. Biophys. Acta 1224:68-76. También se describe una proteína G de la rabia en el documento EP 0445625.

Envueltas alternativas

25 Otras envueltas que pueden usarse para pseudotipar los vectores lentivíricos incluyen Mokola, Ébola, 4070A y LCMV (virus de la coriomeningitis linfocítica).

VECTORES DE VIRUS ADENOASOCIADOS

30 Se ha sabido en la técnica que los vectores de virus adenoasociado (AAV) tienen capacidad de empaquetado limitada, por lo tanto, afectan de forma negativa a la cantidad de genes que pueden suministrarse de forma eficaz. Sin embargo, ahora se sabe que esta limitación depende del serotipo AAV. Por ejemplo, las cápsidas de los serotipos AAV 5 y 7 pueden empaquetar genomas de hasta 8 kb. Este trabajo se ha descrito en el documento US 7.943.374. Además, el documento US 2009/0214478 describe vectores recombinantes AAV2/5 con una capacidad de empaquetado de hasta 9 kb.

35 Las características de los vectores AAV son generalmente conocidas para los expertos en la materia. Por ejemplo, los vectores AAV tienen un amplio rango de hospedador y transducen tanto células en división como células que no están en división con inmunogenicidad relativamente baja. También es bien sabido el modo en que remplazar todos los genes víricos de AAV con un casete genético dejando en su lugar solamente los elementos de AAV de acción en *cis*, las repeticiones terminales invertidas (ITR), la secuencia de empaquetado del ADN y el origen de replicación. Véase, por ejemplo, Musatov et al., J. Virol., Dic. 2002, 76(24). El AAV puede empaquetarse en células productoras cuando los productos génicos de AAV, Rep y Cap, y otras proteínas accesorias se proporcionan en trans. Se han descrito sistemas de empaquetado de AAV. Véase, por ejemplo, el documento US 5.139.941. Las funciones accesorias que no son de AAV pueden suministrarse por cualquiera de los virus auxiliares conocidos tales como adenovirus, virus del herpes simple virus vaccinia. Dichos sistemas de empaquetado de AAV se han descrito; por ejemplo, en el documento US 4.797.368; el documento US 5.139.941; el documento US 5.866.552; el documento US 6.001.650; el documento US 6.723.551.

OPTIMIZACIÓN DE CODONES

50 Los polinucleótidos usados en la presente descripción (incluyendo la NOI y/o los componentes del vector) pueden optimizarse en sus codones. La optimización de codones se ha descrito previamente en el documento WO 99/41397 y en el documento WO 01/79518. Diferentes células difieren en su uso de codones particulares. Esta desviación de codones corresponde a una desviación en la abundancia relativa de ARNt particulares en el tipo celular. Alterando los codones en la secuencia de modo que se adapten para acoplar con la abundancia relativa de los ARNt correspondientes, es posible aumentar la expresión. Del mismo modo, es posible disminuir la expresión eligiendo deliberadamente codones para los que sabe que los ARNt correspondientes son infrecuentes en el tipo celular particular. Por tanto, está disponible un grado adicional de control de la traducción.

60 Muchos virus, incluyendo el VIH y otros lentivirus, usan una gran cantidad de codones infrecuentes y cambiando estos para que correspondan con los codones de mamífero habitualmente usados, puede conseguirse una expresión aumentada del gen de interés, por ejemplo, una NOI o componentes de empaquetado en células productoras de mamífero. Las tablas de uso de codones son conocidas en la técnica para las células de mamífero, así como para una diversidad de otros organismos.

La optimización de codones de componentes de vector vírico tiene otras varias ventajas. En virtud de las alteraciones en sus secuencias, las secuencias de nucleótidos que codifican los componentes de empaquetado de las partículas víricas requeridas para el ensamblaje de las partículas víricas en las células productoras/células de empaquetado tienen secuencias de inestabilidad de ARN (INS) eliminadas de las mismas. Al mismo tiempo, la secuencia codificante de la secuencia de aminoácidos para los componentes de empaquetado se retiene de modo que los componentes víricos codificados por las secuencias permanecen iguales, o al menos suficientemente similares de modo que no esté comprometida la función de los componentes de empaquetado. En vectores lentivíricos, la optimización de codones también supera la necesidad de Rev/RRE para la exportación, haciendo que las secuencias optimizadas sean independientes de Rev. La optimización de codones también reduce la recombinación homóloga entre diferentes construcciones dentro del sistema de vector (por ejemplo, entre las regiones de solapamiento en las fases de lectura abierta de gag-pol y env). El efecto global de la optimización de codones es, por lo tanto, un aumento notable en el título del virus y seguridad mejorada.

Solamente los codones relacionados con INS pueden optimizarse. Sin embargo, más preferiblemente y de forma práctica, las secuencias pueden optimizarse en sus codones en su totalidad, con algunas excepciones, por ejemplo, la secuencia que abarca el sitio de desplazamiento de fase de gag-pol (véase a continuación).

El gen *gag-pol* comprende dos fases de lectura solapantes que codifican las proteínas gag-pol. La expresión de ambas proteínas depende de un desplazamiento de fase durante la traducción. Este desplazamiento de fase sucede como resultado del "deslizamiento" del ribosoma durante la traducción. Se cree que este deslizamiento está causado al menos en parte por estructuras secundarias de ARN estancadas del ribosoma. Dichas estructuras secundarias existen en dirección 3' del sitio de desplazamiento de fase en el gen *gag-pol*. Para VIH, la región de solapamiento se extiende desde el nucleótido 1222 en dirección 3' del inicio de *gag* (donde el nucleótido 1 es la A del ATG de *gag*) hasta el final de *gag* (nt 1503). Por consiguiente, un fragmento de 281 pb que abarca el sitio de desplazamiento de fase y la región solapante de las dos fases de lectura preferiblemente no se optimiza en los codones. Reteniendo este fragmento, se posibilitará una expresión más eficaz de las proteínas gag-pol.

Para EIAV, el inicio del solapamiento se ha considerado en el nt 1262 (donde el nucleótido 1 es la A del ATG de *gag*). El final del solapamiento es en 1461 pb. Para asegurar que el sitio de desplazamiento de fase y el solapamiento de *gag-pol* se conservan, se ha retenido la secuencia de tipo silvestre desde el nt 1156 al 1465.

Pueden hacerse derivaciones desde el uso de codones óptimo, por ejemplo, para acomodar sitios de restricción convenientes y pueden introducirse cambios conservativos de aminoácidos en las proteínas gag-pol.

La optimización de codones puede basarse en genes de mamífero poco expresados. La tercera y a veces la segunda y la tercera base pueden cambiarse.

Debido a la naturaleza degenerada del código genético, se apreciará que un experto en la materia puede conseguir numerosas secuencias *gag-pol*. También hay muchas variantes retrovíricas descritas que pueden usarse como punto de partida para generar una secuencia *gag-pol* de codones optimizados. Los genomas lentivíricos pueden ser bastante variables. Por ejemplo, hay muchas casi especies de VIH-1 que aún son funcionales. Este es el caso para EIAV. Estas variantes pueden usarse para potenciar partes particulares del proceso de transducción. Pueden encontrarse ejemplos de variantes de VIH-1 en las bases de datos de VIH manejadas por Los Alamos National Security, LLC en <<http://hiv-web.lanl.gov>>. Pueden encontrarse detalles de los clones de EIAV en la base de datos National Center for Biotechnology Information (NCBI) localizada en <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>.

La estrategia para las secuencias *gag-pol* de codones optimizados puede usarse en relación a cualquier retrovirus. Esto se aplicaría a todos los lentiavirus, incluyendo EIAV, VIF, VIB, CAEV, VMR, VIS, VIH-1 y VIH-2. Además, este método podría usarse para aumentar la expresión de genes de HTLV-1, HTLV-2, HFV, HSRV y retrovirus endógenos humanos (HERV), MLV y otros retrovirus.

La optimización de codones puede hacer que la expresión de *gag-pol* sea independiente de Rev. Para posibilitar el uso de factores anti-Rev o RRE en el vector lentivírico, sin embargo, sería necesario hacer que el sistema de generación del vector vírico sea totalmente independiente de Rev/RRE. Por tanto, el genoma también tiene que modificarse. Esto se consigue optimizando los componentes del genoma del vector. De forma ventajosa, estas modificaciones también dan lugar a la producción de un sistema más seguro ausente de todas las proteínas adicionales tanto en la célula productora como en la célula transducida.

ACTIVIDAD

Las construcciones de fusión descritas en este documento producen enzimas de síntesis dopamínérgica funcionales y pueden causar un aumento en la producción de dopamina en comparación con los niveles obtenidos usando una construcción con los tres genes que codifican las enzimas de síntesis de dopamina separadas por secuencias IRES descritas en el documento WO 02/29065.

El vector descrito en este documento puede causar producción aumentada de L-DOPA y/o de dopamina cuando se expresa de forma intracelular que la del vector descrito en el documento WO 2001/04433, pONYK1.

5 El vector descrito en este documento puede dar un aumento de al menos 2, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 80, 90, 100, 120, 130, 140, 150, 160, 200, 500, 1000 veces en la producción de dopamina y/o de L-DOPA.

El vector descrito en este documento puede causar producción aumentada de L-DOPA y/o de dopamina en comparación con pONYK1 cuando se expresa, por ejemplo, en células HEK293T o en células PC-12.

10 La producción de dopamina o de L-DOPA puede medirse por cualquiera de varios métodos conocidos en la técnica, tal como cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).

15 Sin el deseo de limitarse a teoría alguna, los autores de la presente invención sugieren que la síntesis de L-DOPA y/o de dopamina se aumenta por la proteína de fusión porque las proteínas codificadas están físicamente muy juntas, facilitando de ese modo sus interacciones entre sí. Este es particularmente ventajoso para enzimas de la ruta biosintética de dopamina ya que la proximidad física de cada una de las enzimas puede facilitar el flujo eficaz de metabolitos de una enzima a la otra, posibilitando la producción máxima de L-DOPA o de dopamina.

20 Como se muestra en los ejemplos y se resume en la tabla 1 (anterior), algunas construcciones de fusión dan producción mejorada de L-DOPA y algunas dan producción mejorada de dopamina.

COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA

25 El vector lentivírico de la presente invención puede proporcionarse en forma de una composición farmacéutica. La composición farmacéutica puede usarse para tratar a un individuo por terapia génica, donde la composición comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del vector lentivírico.

30 La preparación del virus puede concentrarse por ultracentrifugación. Como alternativa, el documento WO 2009/153563 describe métodos para el procesamiento posterior de vectores lentivíricos. La composición farmacéutica resultante puede tener al menos 10^7 TU./ml, por ejemplo, de 10^7 a 10^9 TU./ml o al menos 10^9 TU./ml. (El título se expresa en unidades de transducción por ml (TU./ml) valorado en líneas celulares convencionales D17 o HEK293T).

35 La composición farmacéutica puede usarse para tratar a un ser humano.

40 La composición puede comprender opcionalmente un vehículo, diluyente, excipiente o adyuvante farmacéuticamente aceptable. La elección del vehículo, excipiente o diluyente farmacéutico puede seleccionarse con respecto a la vía pretendida de administración y la práctica farmacéutica convencional. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender como (o además de) el vehículo, excipiente o diluyente, cualquier aglutinante, lubricante, agente de suspensión, agente de recubrimiento, agentes solubilizante adecuado, y otros agentes de vehículo que puedan ayudar o aumentar a la entrada del virus en el sitio diana (tal como, por ejemplo, un sistema de suministro lipídico).

ENFERMEDADES

45 El vector vírico puede usarse para tratar una afección neurológica. Por ejemplo, el vector puede ser útil para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades neurodegenerativas.

La enfermedad puede tratarse por la producción de L-DOPA y/o de dopamina en un sujeto.

50 La enfermedad puede ser enfermedad de Parkinson.

El tratamiento por terapia génica con vectores capaces de suministrar, por ejemplo, TH, GTP-CH1 y AADC, probablemente es particularmente útil para las fases tardías de pacientes con PD que han llegado a ser refractarios al tratamiento con L-DOPA oral.

55 Ciertas construcciones descritas en este documento aumentaban la producción de L-DOPA, y otras aumentaban la producción de dopamina. La producción aumentada de L-DOPA puede ser útil en pacientes que retienen actividad enzimática AADC residual y son, por tanto, al menos parcialmente capaces de convertir L-DOPA en dopamina. Estos pacientes pueden ser susceptibles a tratamiento convencional con L-DOPA. Por ejemplo, las construcciones de TH-L-CH1-_{IRES}-AADC producían altos niveles tanto de dopamina como L-DOPA, mientras que TH-L-AADC-_{IRES}-CH1 y AADC-L-TH-L-CH1 producían niveles mayores de dopamina respecto a L-DOPA.

60 La producción aumentada de dopamina puede ser útil en pacientes en fase tardía que carecen de suficiente actividad AADC endógena para procesar L-DOPA, y son, por tanto, menos sensibles a tratamiento convencional con L-DOPA.

También se describe un método para seleccionar una terapia para un paciente con enfermedad de Parkinson, que comprende la etapa de seleccionar un vector descrito en este documento basado en su capacidad relativa de producir L-DOPA y dopamina.

5 ADMINISTRACIÓN

El vector vírico usado en la presente descripción se administra al cerebro, por ejemplo, por inyección en el putamen caudado.

10 El vector puede administrarse a través de uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más tramos por hemisferio.

15 En un sistema de administración descrito previamente para un vector lentivírico (Jarraya et al., (2009) Sci Transl Med 14: 1(2) 2-4), la composición del vector se administró de un modo discontinuo o "punteada", administrando una alícuota (4 μ l) en el fondo del tramo, retirando la aguja un poco, después administrando una segunda alícuota (3 μ l) y retirando la aguja otro poco (segunda vez); después administrando una tercera alícuota (3 μ l); por tanto las alícuotas se habían depositado en tres puntos a lo largo de cada tramo de aguja suministrando un total de 10 μ l.

Como alternativa, el vector puede infundirse de forma continua como se describe en la solicitud de patente de Reino Unido n.º 1009052.0 en trámite junto con la presente.

20 La invención se describirá ahora adicionalmente a modo de ejemplos, que se entiende que sirven para ayudar a un experto en la materia a realizar la invención y no pretenden limitar de ninguna manera el alcance de la invención.

Ejemplos

25 Ejemplo 1 - Producción de vector a partir de pONYK-TAiC y producción de catecolamina a partir del vector integrado

30 La primera construcción de fusión a generar y ensayar con vistas a mejorar el título en comparación con pONYK1 fue pONYK-TAiC (figura 1). Se generaron preparaciones de vector lentivírico (LV) usando los genomas pONYK-TAiC o pONYK1 por triplicado, y los títulos de vector resultantes se cuantificaron por ensayo de integración de ADN (figura 2a). Estos datos demostraron sorprendentemente que los títulos del vector generado a partir de pONYK-TAiC eran iguales que pONYK1, la eliminación de un elemento IRES no mejoraba el título. Se realizó análisis de HPLC sobre los sobrenadantes de células HEK293T transducidas para examinar los niveles de L-DOPA y de dopamina producidos. Los resultados de HPLC (figura 2b) demostraron que las células transducidas con el vector pONYK-TAiC producían un aumento de 2,4 veces en los niveles de catecolaminas totales en comparación con células transducidas con el vector pONYK1. Los niveles de L-DOPA eran comparables entre ambos genomas, sin embargo, los niveles de dopamina eran 15,3 veces mayores para pONYK-TAiC que para pONYK1. Por tanto, se mejoró la producción de catecolamina. Globalmente, esto implica que la ruta biosintética de dopamina es más eficaz cuando las células se transducen con el vector pONYK-TAiC en comparación con el vector pONYK1.

40 Ejemplo 2 - Producción del vector y producción de catecolamina a partir de vectores integrados

45 Se ensayaron otros tres plásmidos de fusión de enzima de dopamina (pONYK-ATiC, pONYK-TCiA, pONYK-ATC (figura 1) junto con pONYK-TAiC y pONYK1. Se generaron preparaciones de LV usando cada uno de los diferentes plásmidos de genoma por triplicado y el vector resultante se cuantificó por ensayo de integración de ADN (figura 3a). Los resultados demostraron que los títulos eran similares para todos los vectores, variando los títulos de 1,3E+05 TU/ml a 4,0E+05 TU/ml. De forma interesante, pONYK-ATC que carecía de ambos elementos IRES no mostraba un aumento en el título. Esto sugiere que las construcciones de fusión no alteran la producción del vector y el reordenamiento de los transgenes y la presencia del conector o conectores GS15 no afecta a los títulos. Los resultados del análisis de HPLC demostraron que células HEK293T transducidas con cada uno de los diferentes vectores daba lugar a diferente producción de catecolamina (figura 3b). Además, la cantidad de L-DOPA convertida en dopamina variaba significativamente entre los diferentes vectores. El vector pONYK1 demostró los niveles más bajos de producción de dopamina y la conversión más baja de L-DOPA en dopamina. El vector generado usando pONYK-TCiA demostró la mayor producción de catecolamina (4,8 veces mayor que pONYK1), siendo los niveles de dopamina 13,2 mayores que pONYK1.

55 Por tanto, parece que cuando TH y CH1 se expresan como una única unidad, se producen los niveles más altos de catecolaminas. De forma interesante, fusionar los tres genes juntos para producir una construcción de fusión triple (pONYK-ATC) que produce una proteína, demostró que la producción de dopamina aumentaba (9,3 veces) en comparación con pONYK1.

60 Ejemplo 3 - Evaluación de los niveles de enzima de dopamina en células HEK293T transfectadas con diferentes plásmidos de fusión

65 Para investigar los niveles de expresión de proteína, se realizaron análisis de transferencia de Western para cada uno de los productos transgénicos (AADC, CH1 y TH) a partir de lisados celulares de células HEK293T que se

habían transfectado con cada uno de los plásmidos de genoma de fusión (figura 4). Los resultados demostraron que para cada una de las diferentes construcciones de fusión, cada una de las enzimas de síntesis de dopamina estaba presente y del tamaño predicho. Esto demuestra que cada una de las construcciones de genoma era capaz de expresar las enzimas de síntesis de dopamina con conectores GS15, incluyendo el casete de fusión triple (pONYK-ATC), como una banda de 124 kDa que se observa en las tres transferencias de Western; esto es el tamaño esperado para una proteína de fusión que contiene las tres proteínas de enzima de dopamina ligadas. Los niveles de cada una de las diferentes proteínas expresadas por las diferentes construcciones de los genomas varían considerablemente. Los mayores niveles de las tres proteínas parecen haberse expresado a partir de pONYK1, pONYK-TAiC y pONYK-TCiA. Los niveles más bajos de proteínas se observaron a partir de pONYK-ATC.

5 Los niveles de expresión de proteína de fusión varían considerablemente entre las tres construcciones de genoma. Los niveles más altos se observan para pONYK1, pONYK-TAiC y pONYK-TCiA. Los niveles más bajos se observan para pONYK-ATC.

10 No parece haber una relación directa entre las intensidades de las proteínas en las transferencias de Western y los resultados de HPLC. pONYK1 demostró uno de los niveles más altos de expresión de proteína, aunque las células HEK293T transducidas con el vector preparado a partir de este plásmido demostraron la producción de dopamina más baja.

15 Ejemplo 4 - Vector y producción de catecolamina a partir de 5 construcciones de fusión

Como se analiza anteriormente, parece que cuando TH y CH1 se expresan como una única unidad, se producen los niveles más altos de catecolaminas. Como los niveles de L-DOPA eran muy altos con pONYK-TCiA, es probable 20 que los niveles de expresión de AADC estén limitando la conversión de L-DOPA en dopamina. Como se sabe que la expresión génica se reduce cuando el gen se coloca después de una secuencia IRES, revertir la orientación de esta configuración podría producir niveles máximos de dopamina aumentando la conversión de L-DOPA en dopamina, por tanto, el gen AADC se coloca primero en el casete de expresión (posterior al promotor CMV para maximizar su expresión seguido por un IRES y después la fusión TH:CH1). Por tanto, se generó esta construcción de genoma 25 (pONYK-ATC, figura 1). Los resultados de transferencia de Western de las células transfectadas por pONYK-ATC demostraron niveles bajos de la proteína de fusión grande (ejemplo 3). Sin embargo, a pesar de estos niveles bajos aparentes, las células que se transdijeron con el vector preparado a partir de pONYK-ATC presentaron niveles altos 30 de conversión de L-DOPA en dopamina, que produjo una producción de dopamina de alto nivel. Esto es sorprendente que las tres secuencias codificantes están ligadas juntas, lo que produce una proteína grande (124 kDa) que se expresaba relativamente poco. Dado que el vector generado usando pONYK-TCiA mostraba los niveles más altos de producción de dopamina, y el hecho conocido de que las secuencias IRES reducen la expresión 35 génica, podría ser que una fusión triple de los transgenes colocada en este mismo orden (TH:CH1:AADC) diera lugar a un nivel potenciado de producción de dopamina a partir de células transducidas. Por lo tanto, se generó una construcción de fusión triple adicional, pONYK-TCA (figura 1).

35 Se generó un conector GS 15 modificado en que la secuencia de aminoácidos permanecía inalterada mientras que se alteraba la secuencia de ADN. Este conector se clonó en pONYK-ATC y pONYK-TCA remplazando el conector GS15 original entre los genes TH y CH1. Esto produjo pONYK-ATCmod y pONYK-TCAmod (figura 1). Se generó el vector que usa cada uno de los diferentes plásmidos de genoma por duplicado y el vector resultante se cuantificó 40 por ensayo de integración de ADN (figura 5).

Como puede observarse a partir de los resultados, los títulos del vector para todas las construcciones fueron similares con títulos que varían de 1,2E+05 TU/ml a 5,3E+05 TU/ml. Por tanto, las nuevas construcciones no alteran 45 la producción del vector, de modo que el reordenamiento de los tres genes y la presencia del conector GS15 y/o el conector GS15 modificado no afecta al título.

La producción de catecolamina a partir de las células HEK293T transducidas se realizó por análisis de HPLC y los resultados se muestran en la figura 5b. Los vectores que se generaron a partir de las nuevas construcciones de fusión triple modificadas (ATCmod y TCAmod) demostraron un aumento adicional en los niveles de catecolamina. 50 Los niveles de producción de dopamina a partir de células transducidas con ambas construcciones de fusión triple fueron mucho mayores que los niveles de L-DOPA, lo que sugiere que la conversión de L-DOPA en dopamina era muy eficaz con estas construcciones. Las células transducidas con el vector ATCmod demostraron los niveles más altos de producción de catecolamina con un aumento global de 6,5 veces en la producción de dopamina en comparación con células transducidas con pONYK1. Fue de importancia adicional el hallazgo de que los niveles de 55 dopamina producidos a partir de células transducidas con el vector generado a partir de las construcciones de fusión triple modificadas (usando el conector modificado entre TH y CH1) eran mucho mayores que los producidos a partir del vector generado usando los genomas de fusión triple donde ambos conectores GS15 tenían secuencias de nucleótidos idénticas.

60 Ejemplo 5 - Evaluación de los niveles de enzima de dopamina en células HEK293T transfectadas con nueve plásmidos de fusión diferentes

Para examinar los niveles de expresión de proteína para cada genoma de vector, se realizó análisis de transferencia 65 de Western para cada uno de los productos transgénicos (AADC, CH1 y TH) usando lisados celulares de células HEK293T que se habían transfectado con cada uno de los genomas de vector (figura 6). Los resultados demostraron que para todos los genomas de vector, cada una de las enzimas de síntesis de dopamina estaba

presente y del tamaño predicho, dependiendo de si la enzima se expresaba como una fusión. Esto fue de máxima importancia para las nuevas construcciones que no se habían ensayado previamente (pONYK1-CTiA, pONYK1-AiTC, pONYK1-TCA, pONYK1-ATCmod y pONYK1-TCAmod). Esto demostró que cada una de las construcciones de genoma era capaz de expresar las enzimas de síntesis de dopamina con conectores GS15. Esto incluía los cassetes de fusión triple (TCA y ATC) donde se observaba una banda de proteína del tamaño esperado (124 kDa) en las tres transferencias de Western.

Los niveles más altos de las tres proteínas parecen haberse expresado a partir de pONYK1, pONYK1-TAiC y pONYK1-TCAm (figura 5). Los niveles más bajos de proteína se observaron a partir de pONYK1-ATC que es comparable con los resultados previos (figura 4).

Ejemplo 6 - Evaluación de los niveles de enzima de dopamina en células HEK293T transducidas con nueve vectores de fusión diferentes

Como se describe anteriormente, se realizó análisis de Western sobre lisados celulares de células transfectadas con los plásmidos de fusión (figuras 4 y 6). Esto estuvo seguido por el análisis de los niveles de enzima de síntesis de dopamina de células transducidas con cada uno de los vectores de fusión. El análisis de los niveles de proteína de células transducidas da una mejor idea sobre los niveles de proteínas expresadas a partir del vector funcional resultante. Las células HEK293T que se habían transducido con cada una de las construcciones de fusión se

analizaron por transferencia de Western para la expresión de proteína de cada una de las enzimas de síntesis de dopamina y los resultados se muestran en la figura 8. Las transferencias demostraron que la proteína de tamaño correcto se expresaba para cada casete de genoma de vector. Los datos sugerían que los niveles de proteína se reducen cuando se ha colocado una secuencia codificante posterior al elemento IRES.

Las células transducidas con vector generado usando el conector modificado en las construcciones de fusión triple (ATCmod y TCAmod) demostraron niveles mayores de producción de dopamina en comparación con células transducidas con vector generado a partir de las construcciones con el conector no modificado (ATC y TCA) (figuras 3b y 5b).

Ejemplo 7 - Transducción de neuronas de cuerpo estriado de rata con construcciones de fusión

Se decidió transducir neuronas de cuerpo estriado de rata, la población de células diana para la terapia de remplazo de dopamina, con cada uno de los vectores de fusión y para evaluar la producción de catecolamina a partir de estas células primarias. Se realizó un experimento preliminar usando un vector EIAV-GFP para establecer las condiciones óptimas de transducción para las neuronas (datos no mostrados). La fabricación del vector se realizó usando cada uno de los genomas de vector previamente descritos y los sobrenadantes de vector no concentrados y el vector final concentrado se cuantificó por ensayo de integración de ADN (figura 9). Las preparaciones de vector concentrado se usaron para transducir las neuronas del cuerpo estriado a una MOI 1 y por triplicado. En paralelo, se transdijeron neuronas del cuerpo estriado con un vector EIAV-GFP a una MOI 1. Esto se realizó para que actuara como control para la transducción ya que la visualización de la transducción puede observarse fácilmente por la presencia de células positivas a GFP, y también como control negativo para el análisis de HPLC. Como se observa partir de la figura 10a, las células neuronales se transdijeron satisfactoriamente con EIAV-GFP a una MOI 1.

El análisis de HPLC demostró que la transducción usando una MOI 1 era suficiente para permitir la detección de los niveles de dopamina y L-DOPA en los cultivos de cuerpo estriado (figura 10b). La figura 10b demuestra que neuronas transducidas con el vector TCiA demostraban la mayor producción de catecolaminas (80 ng/ml) que era 160 mayor que neuronas que se han transducido con el vector pONYK1. Sin embargo, la mayoría de las catecolaminas detectadas (73 ng/ml) eran L-DOPA y no dopamina. La conversión de L-DOPA en dopamina a partir de TCiA era, por lo tanto, ineficaz. La conversión ineficaz de L-DOPA en dopamina observada a partir de células transducidas con TCiA es un resultado que ha observado en todos los experimentos hasta la fecha (figuras 3b, 5b, 6b y 10b). Como se analiza previamente, esto se debe casi con toda seguridad a la expresión restringida de AADC. Para que el vector TCiA funcione más eficazmente, en términos de producción de dopamina, los niveles de expresión de AADC tendrían aumentarse. Sin embargo, colocar AADC antes de la construcción de fusión IRES TH-CH1 (AiTC) no proporcionaba una solución ya que los niveles de catecolamina de las neuronas transducidas con este vector eran bajos (figura 10b), presumiblemente debido a los bajos niveles de L-DOPA al colocar TH-CH1 después del IRES. La fusión de los tres transgenes junto con AADC en primer lugar en la configuración no mejoró la conversión de L-DOPA en dopamina (véanse los resultados para las neuronas transducidas con ATC y ATCmod), pero la producción global de catecolamina era inferior en comparación con TCiA. No obstante, los niveles de dopamina conseguidos con este genoma de vector (21,5 mg/ml) eran los más altos de todas las construcciones evaluadas. Esto representa un aumento de 107,5 veces en los niveles de dopamina en comparación con las neuronas transducidas con pONYK1.

La relación de dopamina a L-DOPA de neuronas transducidas con ATCmod era extremadamente alta (5,2), lo que indica una conversión casi total de L-DOPA en dopamina. Esta conversión eficaz de L-DOPA en dopamina también se observó en neuronas transducidas con vector ATC, pero a producción total de catecolamina era inferior. Este resultado se observó previamente a partir de células HEK293T transducidas con vector ATC y ATCmod (figuras 3b y

5b) y confirma que la adición del conector modificado (GS15mod) en ATCmod confiere mayor producción de catecolamina.

5 **Ejemplo 8 - Evaluación de TCiAmod**

10 Como se analiza, el conector GS15 modificado (GS15mod) usado para ligar TH y CH1 en los genomas de fusión triple ATCmod y TCAmad ha demostrado mayor producción de dopamina a partir de las células (neuronas y HEK293T) transducidas con vector preparado a partir de estas construcciones que a partir de células transducidas con vector generado a partir de los genomas precursores (que contienen conectores GS15 idénticos). Se decidió establecer si este conector GS15 modificado daría lugar al aumento de la producción de catecolamina a partir del vector preparado a partir de un genoma de fusión individual. Como la máxima producción de catecolamina se ha observado a partir de células transducidas con el vector TCiA, se decidió remplazar el conector GS15 no modificado en TCiA con el conector modificado para producir TCiAmod (figura 1). Como se observa en la figura 11a, los títulos del vector de TCiAmod frente a pONYK1 y a TCiA eran inferiores (3,4 veces y 2,2 veces inferiores, respectivamente) pero esto probablemente estaba causado por la producción del vector y por la variación del ensayo.

20 La determinación de la producción de catecolamina a partir de las células HEK293T transducidas se realizó por análisis de HPLC y los resultados se muestran en la figura 11b. Las células transducidas con el vector TCiAmod mostraron un aumento de 7 veces en la producción de catecolamina en comparación con células transducidas con el genoma pONYK1. Además, la producción de catecolamina a partir células transducidas con el vector TCiAmod aumentaba en 1,75 en comparación con células transducidas con el vector TCiA. Esto confirma que el conector GS15mod proporciona una ventaja sobre el conector GS15 no modificado, y este fenómeno no está solamente relacionado con las construcciones de fusión triple.

25 Como se informa, TCiA ha demostrado previamente una alta producción de catecolamina, pero las cantidades relativas de dopamina y de L-DOPA son comparables, lo que indica que la conversión de L-DOPA en dopamina por AADC es limitante. Esta tendencia también fue evidente con TCiAmod, presumiblemente ya que AADC aún se está expresando posterior al IRES y, por tanto, no está afectada por el cambio en el conector.

30 **Sumario**

35 Se han construido diez genomas de fusión que expresan AADC, CH1 y TH. Cinco contienen el conector GS 15 en lugar de uno de los elementos IRES (TCiA, TAiC, ATiC, CTiA y AiTC). Las cuatro construcciones restantes son construcciones de fusión triple en que los conectores GS15 han remplazado ambos elementos IRES. Dos de estas construcciones contienen conectores GS15 idénticos (ATC y TCA) mientras que las otras dos construcciones triples contienen la misma organización génica, pero con un conector modificado (GS15mod) colocado entre los genes TH y CH1 (ATCmod y TCAmad). Este conector GS15mod codifica la misma secuencia de aminoácidos, pero tiene una secuencia de ADN diferente al conector GS15 original. El conector GS15mod también se insertó en TCiA remplazando el conector no modificado para producir TCiAmod.

40 Estos estudios ensayaron la hipótesis de que la eliminación de los elementos IRES del genoma tricistrónico pONYK1 y el remplazo con secuencias conectoras puede mejorar los títulos del vector eliminando las estructuras complejas contenidas dentro de los elementos IRES que se creía que impedían la transcripción inversa eficaz. Esta teoría se refutó ya que los títulos de vector de los diferentes genomas de fusión dieron títulos similares a pONYK1. Los títulos en los ensayos variaron, pero una comparación de todos los ensayos no identificó un vector de fusión que diera de forma constante los títulos más bajos, lo que sugiere que ningún genoma de fusión específico confería una baja producción de vector.

50 Los análisis de transferencia de Western (figuras 4 y 8) demostraron que cada una de las enzimas catecolaminérgicas se expresaban y eran del tamaño predicho correcto para cada una de las construcciones de fusión diferentes. También se sugirió a partir del análisis de Western que los niveles de proteína se reducían cuando los transgenes se colocaban en dirección 3' de un elemento IRES.

55 Inesperadamente, la evaluación de las construcciones demostró que la fusión de TH y CH1 proporcionaba el mejor mecanismo para aumentar la producción total de catecolamina, supuestamente debido a la catálisis eficaz de tirosina en L-DOPA por esta fusión TH:CH1.

60 La construcción de genomas de fusión triple (ATC y TCA), usando dos copias del conector GS15, no comprometió la producción de vector y aumentó la producción de catecolamina en comparación con pONKY1.

65 El uso de un conector GS15 modificado (GS15mod) entre los genes TH y CH1 también produjo un aumento en la producción de catecolamina con ambas construcciones, a pesar de no tener evidencias de un aumento en la expresión de proteína. La eficacia aumentada del conector modificado para mediar el aumento de las catecolaminas también se demostró cuando se aplicaba a la configuración TCiA (TCiAmod).

Globalmente, los datos sugieren que los genomas TCiAmod y ATCmod ambos son capaces de mediar la producción mejorada de dopamina en comparación con pONYK1. TCiAmod generalmente media los máximos niveles combinados de L-DOPA y dopamina, mientras que ATCmod generalmente media los niveles más altos de dopamina.

5 Ejemplo 9 - Remplazo del IRES con un promotor constitutivo
 Como la producción de dopamina usando la configuración TCiAmod está limitada por la expresión de AADC mediada por IRES, el remplazo del IRES con un promotor constitutivo puede producir una expresión aumentada de AADC y puede posibilitar mayores niveles de producción de dopamina en células transducidas. Por lo tanto, se crearon dos genomas alternativos que remplazan el elemento IRES en TCiAmod con el promotor PGK o TK (véase la figura 1).

10 Ejemplo 10 - Transducción de neuronas corticales primarias
 15 Se usaron tres vectores de fusión (TACmod, TCiAmod y TCtkA) para transducir neuronas corticales primarias (Innoprot, número de catálogo P10151) por triplicado a una MOI de 0,4. Estos vectores tenían títulos similares a pONYK1 (pONYK1 1,5E+08 TU/ml, TACmod 7,4E+07 TU/ml, TCiAmod 8,4E+07 TU/ml, TCtkA 1,2E+08 TU/ml). Como control, se usó el vector GFP para transducir las neuronas humanas a MOI 2 y 10. Para asegurar que se 20 había producido transducción, se evaluaron las células transducidas con GFP para la fluorescencia de GFP y al final del estudio (9 días después de la transducción) se capturaron imágenes y se muestran en la figura 12a. Se visualizó un alto porcentaje de células con fluorescencia de GFP a ambas MOI 2 y 10, lo que indica que la transducción con el vector GFP a ambas MOI había sido satisfactoria. Se recogieron los sobrenadantes celulares para el análisis por HPLC de catecolamina 5 días (recolección 1) y 9 días (recolección 2) después de la transducción. Los resultados del 25 análisis de HPLC en la recolección 1 se muestran en la figura 12b. Los datos de HPLC de la recolección 2 fueron comparables a los observados de la recolección 1 (datos no mostrados).

30 Las células transducidas con TCtkA mostraron producción significativa de L-DOPA (>25 veces mayor que pONYK1) aunque una baja producción de dopamina (inferior a pONYK1), lo que sugiere una conversión ineficaz de L-DOPA en dopamina.

35 El mayor nivel de producción de dopamina se observó de células transducidas con TCiAmod, que muestran una mejora de 7,4 veces en la producción de dopamina en comparación con las transducidas con pONYK1. Además, los niveles de L-DOPA no excedían la producción de dopamina, lo que sugiere una conversión eficaz de L-DOPA en dopamina.

40 Además del análisis de HPLC, se realizaron transferencias de Western para evaluar los niveles de proteína TH y AADC expresados a partir de neuronas corticales humanas transducidas con los diferentes vectores. Estos resultados se muestran en las figuras 13a y b. Las transferencias de Western demostraron que se expresaban las 45 enzimas de síntesis de dopamina de tamaño correcto (TH y AADC) a partir de neuronas humanas transducidas con los diferentes vectores.

45 Los niveles de AADC (figura 13b) apenas podían detectarse de células transducidas con TCtkA, lo que puede explicar la alta relación de L-DOPA:dopamina para células transducidas con esta construcción como se describe anteriormente.

50 Ejemplo 11 - Evaluaciones del comportamiento y de imágenes de PET de TCiA(mod) y pONYK1 en un modelo de primate no humano de enfermedad de Parkinson

55 El objetivo del estudio, que está en progreso, es comparar dos niveles de dosis de TCiA(mod) con un único nivel de dosis de pONYK1 sobre la recuperación del comportamiento de primates no humanos tratados con MPTP; además, se realizan imágenes PET de ¹⁸F-FMT y ¹⁸F-Faliprida en todos los animales con enfermedad de Parkinson estable antes de la cirugía y de nuevo 3 meses después de la inyección para evaluar los niveles de AADC y receptor D2/D3 respectivamente, se usaron animales sanos como control para determinar los niveles basales normales de cada radioindicador.

60 Se tratan cuatro grupos, cada uno de cuatro macacos cangrejeros lesionados con MPTP con vector vírico como se describe a continuación (la lesión con MPTP y la administración del vector se detallan en materiales y métodos). Se hace un seguimiento de cada grupo durante hasta 6 meses después de la administración del vector:

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
pONYK1 (dosis de potencia completa)	2 animales		2 animales	
TCiA(mod) (dosis de potencia completa)	2 animales		2 animales	
TCiA(mod) (1/5 de la dosis)		2 animales		2 animales
LacZ		2 animales		2 animales

Los cuatro animales del grupo 1 reciben exploraciones PET basales de ¹⁸F-FMT y ¹⁸F-Faliprida. Además, cada animal de los cuatro grupos experimenta (véase materiales y métodos para los detalles):

- 1 exploración basal de RM
- 5 • 1 mes de caracterización basada en video de la actividad locomotora basal (evaluada por Ethovision)
- 2 meses de intoxicación con MPTP y evaluación basada en video de la actividad locomotora (Ethovision)
- 1 exploración PET de ¹⁸F-FMT posterior a MPTP
- 1 exploración PET de ¹⁸F-Faliprida posterior a MPTP
- 10 • 1 exposición a L-DOPA oral y 1 exposición de control oral según lo necesario, cada una seguida por análisis con Ethovision (más de 6 horas de película)
- 1 una muestra de sangre recogida antes de la administración del virus
- 1 procedimiento quirúrgico para suministrar el vector al cerebro
- Seguimiento del comportamiento (Ethovision), después del tratamiento durante 3 meses (0-3 meses)
- 1 exploración de RM a los 3 meses después del tratamiento
- 15 • 1 exploración PET de ¹⁸F-FMT a los 3 meses después del tratamiento
- 1 exploración PET ¹⁸F-Faliprida a los 3 meses después del tratamiento
- 1 exposición a L-DOPA oral y 1 exposición de control oral según lo necesario, cada una seguida por análisis con Ethovision (más de 6 horas de película) a los 3 meses después del tratamiento
- 20 • Seguimiento del comportamiento (Ethovision) después del tratamiento durante 3 meses adicionales (3-6 meses)
- 1 muestra de sangre recogida antes de la eutanasia
- Eutanasia (perfusión transcardiaca y extracción del cerebro)

Análisis histológico póstumo incluyendo tinción para: NeuN, GFAP, Ibal, AADC, CH1 y TH o β gal.

- 25 La figura 14 muestra que 1/5 de la dosis de TCiA (OXB-102) es más eficaz que pONYK1 en la mejora de los síntomas de la enfermedad de Parkinson evaluados por el valor de clasificación clínica. Los animales tratados con ElAV-LacZ de control aún estaban gravemente impedidos en estos puntos temporales.
- 30 Las imágenes PET de Faliprida de la figura 15 muestran un aumento relativo en los receptores D2/D3 de dopamina después de la lesión con MPTP en comparación con la medida inicial que disminuye después del tratamiento con el vector OXB-102. Las imágenes PET de FMT muestran una disminución relativa en la expresión de AADC en el putamen después de la lesión con MPTP en comparación con la medida inicial que aumenta en el putamen después del tratamiento con el vector OXB-102.

35 Materiales y métodos

Líneas celulares

- 40 Las células HEK293T usadas para la transfección transitoria se obtuvieron de M Calos (Stanford University). Las células HEK293T se mantuvieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Sigma, Poole, RU, Cat. D5671) que contenía suero bovino fetal (FCS) al 10 % (/v) obtenido de PAA y suplementado con L-Glutamina 2 mM (Sigma, Cat. G7513) y aminoácidos no esenciales al 1 % (Sigma, M7145).

Neuronas del cuerpo estriado de rata

- 45 Se retiró el cuerpo estriado de ratas Wistar (día embrionario 18) como se describe previamente (Mazarakis *et al.*, 2001) y se combinaron los cuerpos estriados y se prepararon los cultivos como se describe previamente (Azzouz *et al.*, 2002). Los cultivos resultantes se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad de 7,5E+04 células por pocillo en 500 μ l de medio neurobasal y se mantuvieron en una incubadora a 37 °C que contenía CO₂ al 5 %.

- 50 Antes de la transducción, se retiró el medio de cada pocillo y se combinaron 250 μ l de nuevo cada pocillo, esto aseguró que cada pocillo contenía un volumen igual de medio acondicionado. La cantidad requerida de vector para conseguir una MOI 1 se añadió a cada pocillo por duplicado o triplicado. Para el control negativo, se transdujeron dos pocillos de neuronas del cuerpo estriado con un vector de expresión de GFP a una MOI 1 (pONYK-GFP, Lote: KG120310). De tres a seis horas después de la transducción, se añadieron 250 μ l de medio a cada pocillo.

- 60 Para medir la producción de catecolamina, los cultivos neuronales se cultivaron durante 4 días después de la transducción, cuando se añadió L-tirosina a cada pocillo a una concentración final de 100 μ M y los cultivos se incubaron durante una noche. La siguiente mañana se recogieron 400 μ l de sobrenadante de cultivo neuronal y se colocaron en tubos que contenían 40 μ l de ácido perclórico 2 M y 40 μ l de metabisulfito sódico y las muestras se procesaron para el análisis de catecolamina por detección por HPLC como se analiza previamente.

Neuronas corticales primarias humanas

Se obtuvieron neuronas crioconservadas humanas de Innoprot (Cat. P10151, Lote. 6195, 5E+06 células/vial). Una placa de 24 pocillos se recubrió con poli-L-lisina (PLL) (Innoprot, Cat. PLL) a 2 ug/cm². Las neuronas humanas se descongelaron y se resuspendieron a una densidad de 1,2E+06 células/ml en medio neuronal sin suero suplementado con suplemento de crecimiento neuronal (NGS) y solución de penicilina/estreptomicina (Innoprot Cat. P60157). La suspensión neuronal diluida se añadió al centro de un pocillo de la placa recubierta con PLL a 6E+04 células/pocillo, en un volumen total de 50 µl. La placa se incubó a 37 °C durante 30 minutos para permitir que se adhirieran las neuronas, tiempo después del cual los pocillos se lavaron abundantemente con 0,5 ml de medio neuronal completo. Las células se incubaron a 37 °C durante 4 días antes de la transducción. Antes de la transducción, el medio se retiró de cada pocillo y se combinó y se añadieron 250 µl a cada pocillo, esto aseguró que cada pocillo contenía un volumen igual de medio acondicionado. La cantidad requerida de vector para conseguir una MOI 0,4 se añadió a cada pocillo por triplicado. Como control, se transdijeron neuronas con un vector de expresión de GFP a MOI 2 y 10 (pONYK-GFP, Lote: KG290711). De tres a seis horas después de la transducción, se añadieron 250 µl de medio a cada pocillo.

Para medir la producción de catecolamina, los cultivos neuronales se cultivaron durante 4 días después de la transducción cuando se añadió L-tirosina a cada pocillo a una concentración final de 100 µM y los cultivos se incubaron durante una noche. La siguiente mañana se recogieron 300 µl de sobrenadante de cultivo neuronal y se colocaron en tubos que contenían 30 µl de ácido perclórico 2 M y 30 µl de metabisulfito sódico y las muestras se procesaron para el análisis de catecolamina por detección por HPLC como se analiza previamente. Las muestras neuronales de control que se habían transducido con vector de GFP se analizaron para la fluorescencia de GFP para asegurar que se había producido la transducción y se capturaron y documentaron las imágenes.

25 Plásmidos

El plásmido de genoma pONYK1 mínimo, se ha descrito recientemente como pONY8.9.4TY (que contiene el gen KanR) (Jarraya et al., 2009 *Science Translational Medicine* 1, 2ra4). Este plásmido se basaba en pONY8.0T que se describe en mayor detalle por Azzouz M et al., (Azzouz et al., 2002 *J Neurosci* 22, 10302-10312). En resumen, 30 pONYK1 es un genoma de vector EIAV SIN en que se insertó un casete que contenía (en orden): *Neo*, un promotor interno de CMV, truncado, tirosina hidroxilasa humana (TH) de codones optimizados, sitio interno de entrada del ribosoma (IRES) de EMCV, aminoácido aromático dopa descarboxilasa humana (AADC) de codones optimizados, IRES de poliovirus, GTP-ciclohidrolasa I (GTP-CH1) y el elemento de regulación post-transcripcional de virus de la hepatitis de la marmota (WPRE). Los plásmidos de fusión que contienen dos genes fusionados y un elemento IRES 35 de PV (figura 1: pONYK-ATiC, pONYK-TAiC, pONYK-TCiA, pONYK-CTiA y pONYK-AiTC) se generaron insertando regiones de ADN sintetizado (GeneArt, Alemania) en el casete tricistrónico remplazando la región IRES de EMCV y el codón de parada del primer gen con un conector GS15. El conector GS15 codifica 4 aminoácidos de glicina seguidos por 1 aminoácido de serina, repetido por triplicado, que produce un conector de quince aminoácidos. La 40 secuencia de ADN para este conector GS 15 es la siguiente: GGGGGAGGCGGTAGCGGCGGGAGGGGGCTCCGGCGGGAGGGCGGGAGC.

Cuando se generaron las construcciones de fusión triple (figura 1: pONYK-ATC y pONYK-TCA), el elemento IRES 45 de PV se remplazó con un segundo conector GS15. El conector GS15 también se modificó (GS15mod), porque la secuencia de aminoácidos permanecía inalterada mientras que la secuencia de ADN difería. La nueva secuencia de ADN 50 del conector GS15mod es la siguiente: GGAGGTGGCGGGTCCGGGGCGGGGGTAGCGGTGGCGGGGGCTCC.

El conector GS15mod se clonó en las construcciones de fusión triple remplazando uno de los conectores GS 15 no modificados (figura 1: pONYK-ATCmod y pONYK-TCAmod).

55 Los plásmidos de envuelta VSV-G y Gag/Pol sintético de EIAV usados en este estudio fueron pHG y pESGPK, respectivamente.

Producción de vector vírico

Se sembraron células HEK293T en placas de 10 cm a una densidad de 3,5 x 10⁶ células/placa 24 h antes de la transfección. La producción del vector estaba mediada por Lipofectamine™ 2000 CD (Invitrogen, Cat. 12566-101) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, se añadieron las siguientes cantidades de plásmido a 340 µl de OptiPRO™ (Gibco, Cat. 12309-019): 4 µg de plásmido de genoma (véase la figura 1), 2 µg de pESGPK y 0,08 µg de pHG. Esta mezcla de ADN se añadió entonces a una mezcla que contenía 25 µl de Lipofectamine™ CD 2000 y 315 µl de OptiPRO™. A las 14-18 h después de la transfección, se añadió butirato sódico a una concentración final de 10 mM. El medio se cambió 6-8 horas después de la inducción con butirato sódico y 21-23 h después se recogió el vector y se filtró a través de un filtro de jeringa de 0,45 µm. Los títulos de vector, en unidades de transducción/ml (TU/ml), se estimaron por ensayo de título de integración (ADN).

65

Ensayo bioquímico

Para ensayar la funcionalidad de las enzimas de catecolamina codificadas por las diferentes construcciones de fusión, se realizó un ensayo bioquímico que mide la conversión de tirosina en dopamina usando cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Para realizar este ensayo, se transdujeron células HEK293T con el vector de ensayo y control PONYK1, en presencia de 10 µg ml⁻¹ de polibreno (Sigma, n.º cat. H9268). Estas células se cultivaron durante 3 días y después una décima parte de las células se usó para sembrar células para el ensayo bioquímico de catecolamina. Las células restantes se pasaron adicionalmente para el análisis por ensayo de título de integración (ADN) (véase anteriormente). Dos días después, el medio en las células sembradas para el ensayo bioquímico se remplazó con medio suplementado con L-tirosina (Sigma, n.º cat. T1145) a una concentración final de 10 mM y las células se cultivaron durante una noche. La siguiente mañana, se recogieron 800 µl de sobrenadante de cultivo celular y se colocó en tubos que contenían 80 µl de ácido perclórico 2 M (Sigma, n.º cat. 244252) y 80 µl de metabisulfito sódico (Sigma, n.º cat. S9000). Las muestras se mezclaron minuciosamente y una vez se hubo formado un precipitado, las muestras se centrifugaron a 10.000 x g durante 10 minutos para retirar cualquier desecho. El sobrenadante entonces se retiró a tubos separados y se congeló en un congelador a -80 °C hasta que pudo realizarse el análisis por HPLC. Además, se averiguó la cantidad de células en el momento de la recolección.

Previamente al análisis por HPLC, las muestras se descongelaron y se filtraron a través de un filtro de PTFE ultra puro de 0,2 µm (Millipore, n.º cat. UFC30LG25). Los sobrenadantes, junto con los patrones de catecolamina de HPLC, se aplicaron a un sistema de HPLC (Dionex) equipado con un detector electroquímico ESA Coulochem II (ESA Analytical). Las catecolaminas se separaron usando una columna en fase inversa C-18 (ESA Analytical) equilibrada con Cat-A-Phase (ESA Analytical) a un caudal de 1,5 ml/min y después se detectó electroquímicamente. Este ensayo HPLC se optimiza para la detección de L-DOPA, ácido dihidroxifenilacético (DOPAC) y dopamina (DA) y los resultados se expresan como la cantidad de ng de L-DOPA, DOPAC o DA por 10⁵ copias de genoma de vector integrado.

Detección de enzimas catecolaminérgicas por análisis de transferencia de Western

Las células HEK293T que se habían transfectado de forma transitoria con los componentes del vector se lisaron en tampón de fraccionamiento (Tris Cl 0,1 M, pH 7,3, Nonidet P40 (BDS, n.º cat. 56009) al 0,2 % (v/v). Se averiguó la concentración total de proteína y se cargaron 10 µg en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 4-20 % (Invitrogen, n.º cat. _EC60285BOX). Se realizó transferencia de Western usando uno de los siguientes: anticuerpo anti-CH1 (obtenido del Dr E. Werner, Austria), anticuerpo anti-TH (Chemicon, Livingstone, RU, Cat. AB152) o anticuerpo anti-AADC (Chemicon, Cat. AB136). La incubación del anticuerpo primario estuvo seguida por incubación con un anticuerpo secundario contra conejo conjugado con peroxidasa (DAKO, Ely, RU, Cat. P0448). La visualización se realizó con el kit de detección de transferencia de Western ECL Advance (GE Healthcare UK Ltd, Little Chalfont, Cat. RPN2135).

Grabación en video y análisis por Ethovision

La habituación a la jaula de video (no requiere película) se realiza durante 3 sesiones, cada una de 30 minutos. Se evalúa la cuantificación locomotora basal por cinco videos de 30 minutos grabados en jaulas de video personalizadas usando el software de captura Media Recorder (Noldus). Todos los videos se analizan usando un software de seguimiento de objetos, Ethovision (Noldus). La actividad locomotora basal de cada animal consiste en la actividad locomotora media calculada como la distancia total recorrida (TDT) en los últimos tres videos captados antes de que comience la intoxicación con MPTP. La exposición a L-DOPA oral no se realiza en la medida inicial antes de la intoxicación con MPTP.

Intoxicación con MPTP

Los animales (hasta cuatro cada vez) se tratan con una dosis de 0,2 mg/kg de MPTP durante 7 días a través de administración intramuscular con al menos cinco días de interrupción antes del inicio de un nuevo ciclo de MPTP. Los ciclos de MPTP se repiten hasta que se ha reducido la actividad locomotora entre un 80-90 % de la actividad basal media y los valores clínicos son al menos 8/14. Se requiere un valor de comportamiento parkinsoniano estable durante al menos tres semanas antes de realizar las exploraciones PET y/o el tratamiento con vectores víricos. La valoración clínica se adapta de Papa y Chase (Papa y Chase 1996 Ann. Neurol 39, 574-578) y se usa para controlar las deficiencias motoras inducidas por MPTP en una base diaria tras el inicio de la intoxicación con MPTP y hasta el tratamiento con vectores víricos. Se adquiere un video de 30 minutos en una base semanal empezando tres días después de la última inyección con MPTP para cuantificar la actividad locomotora. Una vez los animales se han evaluado como enfermedad de Parkinson estable durante tres semanas (variación TDT ≤15 %) se realiza una exposición a L-DOPA y una exposición diferente de control negativo requerida y los animales se graban durante seis horas para el análisis por Ethovision para determinar el mejor periodo activo de 30 minutos a comparar con un video de 30 minutos de tiempo inactivo.

Los animales se amamantan y la nutrición se complementó por sonda (por vía oral) si la pérdida de peso excedía de un 12 %.

Estudios de imágenes

5 RM: se adquieren RM estereotácticas usando imágenes 3D ponderadas T2 antes de la cirugía para establecer las coordenadas de inyección. Todas las imágenes se adquieren en un sistema horizontal 7Tesla (Varian-Agilent Technologies, EE.UU.) equipado con una espiral de gradiente que alcanza 100 mT/m (tiempo de elevación de 300 µs) y una espiral 1H de radiofrecuencia circular (diámetro interior de 12 cm).

10 PET: se realizan exploraciones de ¹⁸F-FMT y ¹⁸F-Faliprida en todos los animales una vez se han evaluado con enfermedad de Parkinson estable como se describe anteriormente. Inicialmente, se captan imágenes de los animales de control sanos con ¹⁸F-FMT y ¹⁸F-Faliprida para establecer el método de cuantificación que se aplica durante todo el estudio. Las exploraciones se realizan con anestesia por propofol usando un escáner PET FOCUS 220 (Siemens) con una resolución axial de 1,5 mm y una sensibilidad de un 4 %. Se toman imágenes de los animales por parejas en diferentes días para permitir la desintegración radiactiva entre los diferentes indicadores.

15 *Cirugía*

20 Los vectores se inyectan en el putamen de cada hemisferio (calculado a partir del atlas cerebral del macaco cangrejero). Para cada hemisferio, la primera inyección de 50 µl es 1 mm caudal de la comisura anterior. La segunda inyección de 50 µl es 4 mm caudal de la comisura anterior. Las inyecciones de 50 µl de depósitos por hemisferio 2x se hacen a un caudal de 3 µl/min en anestesia con propofol usando una aguja de acero inoxidable roma de calibre 28 y 51 mm de longitud fijada a una jeringa de vidrio Hamilton de 100 µl. También se usan sondas guía para asegurar la colocación correcta del depósito de vector.

25 *Seguimiento del comportamiento posterior al tratamiento*

30 La lactancia continúa según lo necesario.

35 Se graba un video de 30 minutos cada semana empezando 3 semanas después de la cirugía y finalizando 3 meses después de la cirugía. Entre 3 y 6 meses después de la cirugía se graba un video de 30 minutos cada 2 semanas. Se realiza la valoración clínica semanalmente entre 0 y 3 meses después de la cirugía y cada dos semanas entre 3 y 6 meses después de la cirugía. La evaluación del valor de clasificación clínica se describe en Jarraya et al., 2009, Science Translational Medicine 1: 2ra4.

40 Se realiza una exploración RM, exploraciones PET de ¹⁸F-FMT y ¹⁸F-Faliprida a los 3 meses después de la cirugía. También se realiza exposición a L-DOPA a los 3 meses después de la cirugía y los animales se graban durante 6 horas para el análisis por Ethovision. También se realiza una exposición de control negativo según lo necesario seguido por análisis por Ethovision.

45 *Análisis póstumo*

50 Despues de la eutanasia, se retiran los cerebros y se procesan antes de teñirlos con anticuerpos y βgal.

55 Serán evidentes diversas modificaciones y variaciones de los métodos descritos y del sistema de la invención para los expertos en la materia sin alejarse del alcance de la invención. Aunque la invención se ha descrito en relación con realizaciones preferidas específicas, debe entenderse que la invención reivindicada no debe limitarse indebidamente a dichas realizaciones específicas. De hecho, se pretende que diversas modificaciones de los modos descritos para realizar la invención que son obvias para los expertos en biología molecular, virología, neurobiología o campos relacionados estén dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

60 **LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> OXFORD BIOMEDICA (UK) LIMITED

<120> Construcción

<130> P042870PCT

<150> GB 1118636.8

<151> 28-10-2011

<160> 10

<170> PatentIn versión 3.5

65 <210> 1
<211> 45

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Secuencia codificante de conector

<400> 1
 ggaggtggcg ggtccggggg cgggggtagc ggtggcgggg gctcc 45

10 <210> 2
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Cebador
 <400> 2

20 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

25 <210> 3
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia codificante de conector

30 <400> 3
 gggggaggcg gtagcggcgg agggggctcc ggcggaggcg ggagc 45

35 <210> 4
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Conector

40 <400> 4

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 20 25

45 <210> 5
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Conector

<400> 5

Asn Phe Ile Arg Gly Arg Glu Asp Leu Leu Glu Lys Ile Ile Arg Gln
 1 5 10 15

Lys Gly Ser Ser Asn
 20

<210> 6

<211> 23

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Conector

10 <400> 6

Asn Leu Ser Ser Asp Ser Ser Leu Ser Ser Pro Ser Ala Leu Asn Ser
 1 5 10 15

Pro Gly Ile Glu Gly Leu Ser
 20

15 <210> 7

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Conector

<400> 7

Gln Gly Ala Thr Phe Ala Leu Arg Gly Asp Asn Pro Gln Gly
 1 5 10

25 <210> 8

<211> 18

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Conector

35 <400> 8

Ser Gly Gly Gly Glu Ile Leu Asp Val Pro Ser Thr Gly Gly Ser Ser
 1 5 10 15

Pro Gly

40 <210> 9

<211> 148

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> TH truncado unido a AADC por un conector GS15

<400> 9

ggcgctccct ggagggtgtc caggatgagc tggacaccat tgcccatgcg ctgagcgcca	60
tcggcggggg aggccgttagc ggccggagggg gctccggcgg aggccggagc atggacgcca	120
gtgagttccg aaggcgccgc aaggagat	148

5 <210> 10

<211> 50

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> TH truncado unido a AADC por un conector GS15

<400> 10

Arg Arg Ser Leu Glu Gly Val Gln Asp Glu Leu Asp Thr Leu Ala His			
1	5	10	15

Ala Leu Ser Ala Ile Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser		
20	25	30

Gly Gly Gly Ser Met Asp Ala Ser Glu Phe Arg Arg Arg Gly Lys		
35	40	45

Glu Met	
50	

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una construcción que comprende (i) una secuencia de nucleótidos que codifica la tirosina hidroxilasa (TH), (ii) una secuencia de nucleótidos que codifica la GTP-ciclohidrolasa I (CH1) y (iii) una secuencia de nucleótidos que codifica la aminoácido aromático dopa descarboxilasa (AADC), en la que la secuencia de nucleótidos que codifica TH está ligada a la secuencia de nucleótidos que codifica CH1, de modo que codifican una proteína de fusión TH-CH1.
2. Una construcción de acuerdo con la reivindicación 1, que se selecciona de las siguientes:
- 10 TH_L-CH1_{IRES}-AADC;
AADC_L-TH_L-CH1;
TH_L-CH1_L-AADC; y
TH_L-CH1_P-AADC
15 L = secuencia codificante del conector
IRES = sitio interno de entrada del ribosoma
P = promotor
3. Una construcción de acuerdo con la reivindicación 2, que es TH_L-CH1_{IRES}-AADC.
- 20 4. Una construcción de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que tiene la secuencia AADC_{1L}-TH_{L2}-CH1 o TH_{L1}-CH1_{L2}-AADC en la que L1 y L2 son dos secuencias conectoras diferentes.
- 25 5. Una construcción de acuerdo con la reivindicación 2, que tiene la secuencia TH_L-CHL_P-AADC, en la que el promotor es un promotor constitutivo o un promotor específico de tejido.
- 26 6. Un genoma de vector vírico que comprende una construcción de acuerdo con cualquier reivindicación precedente.
7. Un sistema de vector vírico que comprende un genoma de acuerdo con la reivindicación 6.
- 30 8. Un sistema de vector vírico de acuerdo con la reivindicación 7, que es un sistema de vector lentivírico o un sistema de vector vírico adenoasociado.
9. Un sistema de vector lentivírico de acuerdo con la reivindicación 8, que comprende
- 35 (i) un genoma de acuerdo con la reivindicación 6;
(ii) una secuencia o secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas gag y pol;
(iii) secuencias de nucleótidos que codifican otros componentes esenciales de empaquetado del virus no codificados por la secuencia de nucleótidos de ii).
- 40 10. Un método *in vitro* para producir una partícula de vector lentivírico, comprendiendo dicho método introducir en una célula productora:
- 45 i) un genoma de acuerdo con la reivindicación 6,
ii) una secuencia o secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas gag y pol; y
iii) secuencias de nucleótidos que codifican otros componentes esenciales de empaquetado del virus no codificados por una o más de las secuencias de nucleótidos de ii).
- 50 11. Una partícula vírica producida por el sistema de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 o por el método de la reivindicación 10, que comprende las enzimas de síntesis de dopamina GTP-ciclohidrolasa I (CH1), tirosina hidroxilasa (TH) y aminoácido aromático dopa descarboxilasa (AATC), en que TH y CH1 están presentes como una proteína de fusión TH-CH1.
- 55 12. Una partícula de vector vírico de acuerdo con la reivindicación 11, que es una partícula de vector de EIAV y que se pseudotipa con VSV-G.
13. Una composición farmacéutica que comprende una partícula vírica de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, junto con un vehículo o un diluyente farmacéuticamente aceptable.
- 60 14. Una partícula vírica de acuerdo con la reivindicación 11 o 12 o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 13, para su uso en el tratamiento y/o la prevención de una enfermedad neurodegenerativa en un sujeto, induciendo la síntesis de dopamina *in vivo*.
- 65 15. Una partícula vírica o composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 14, en la que la enfermedad neurodegenerativa es enfermedad de Parkinson.

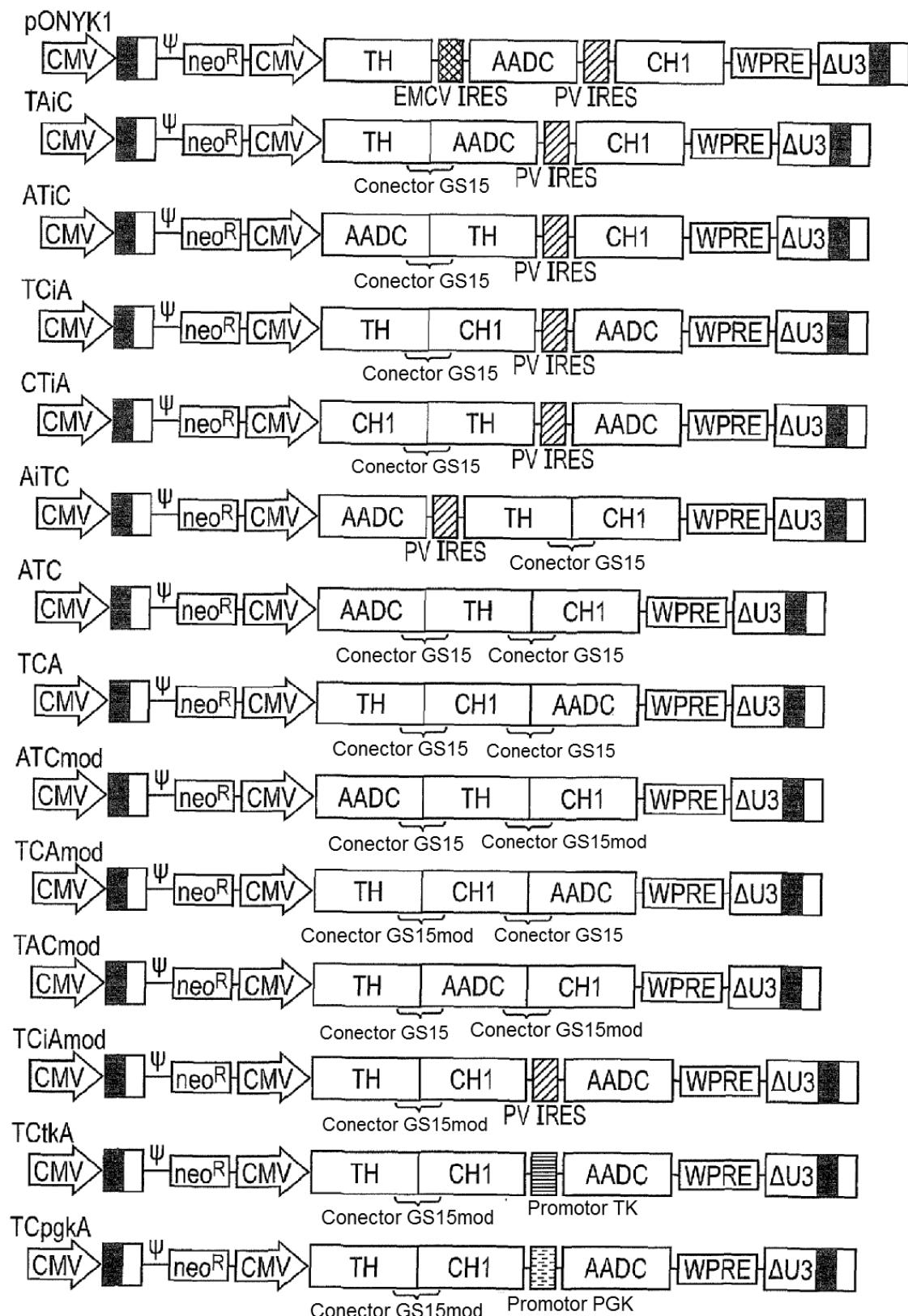


FIG. 1

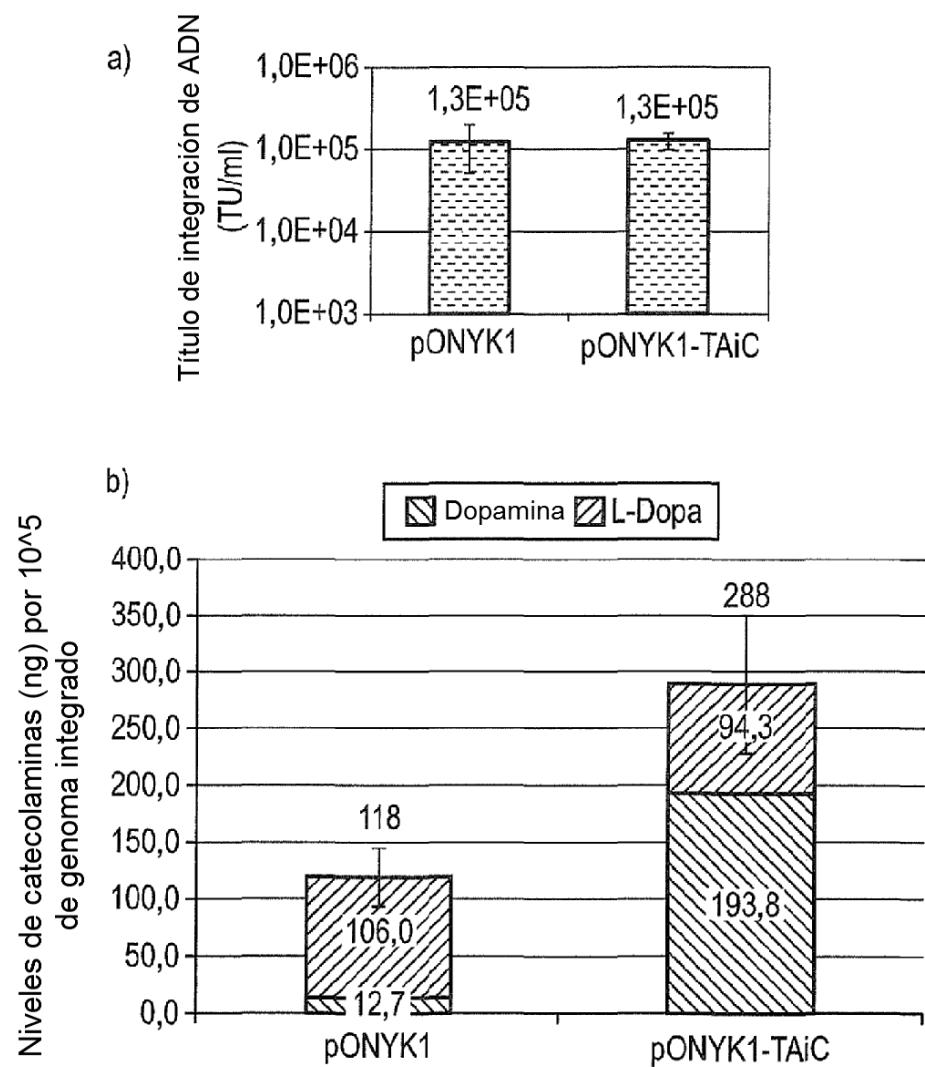


FIG. 2

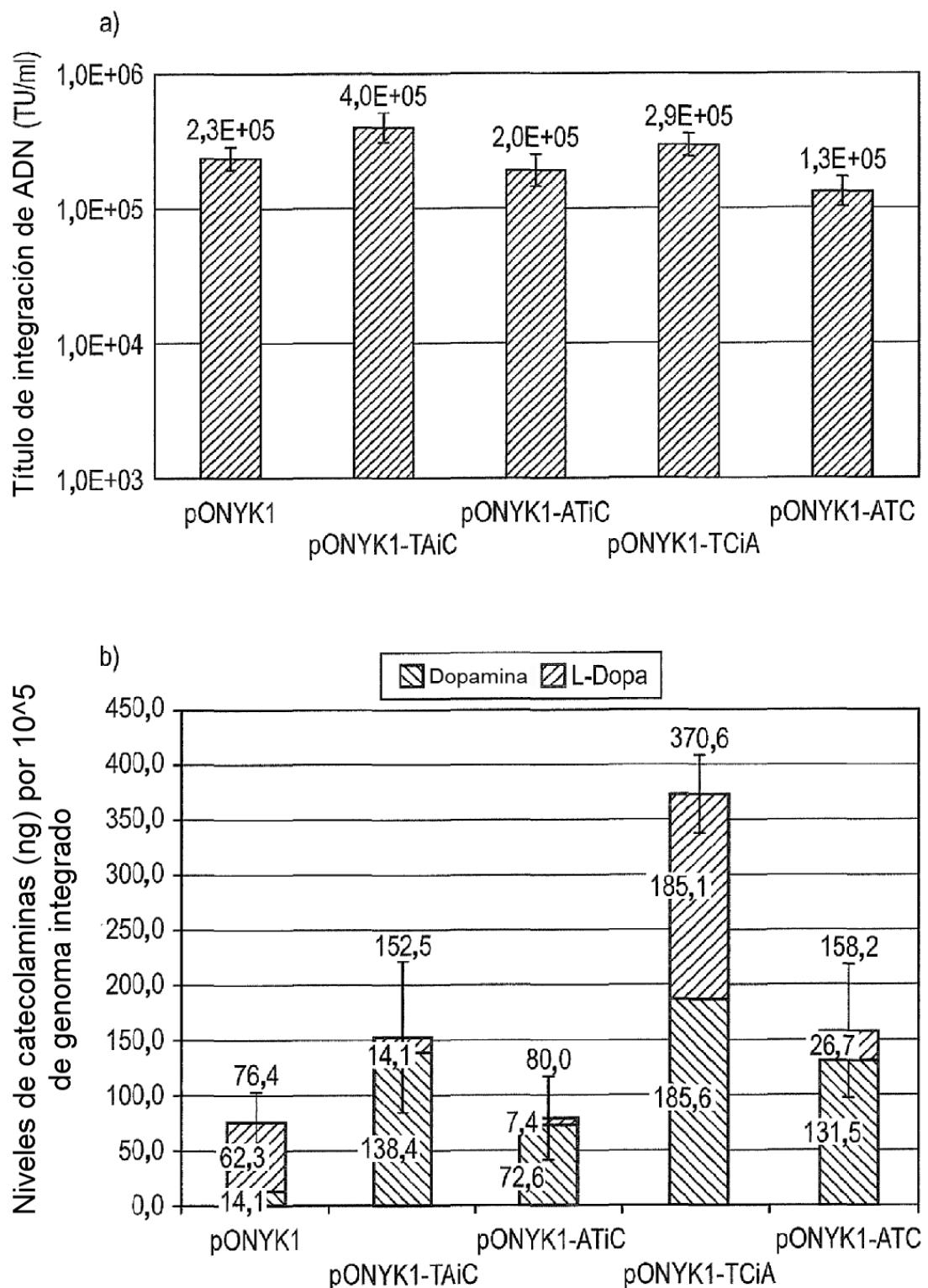


FIG. 3

Tamaños esperados de proteína:

Genoma de EIAV	kDa					
	TH		CH1		AADC	
pONYK1 (patrón)	42	✓	26	✓	26	✓
pONYK-TAiC	98	✓	26	✓	26	✓
pONYK-ATiC	98	✓	26	✓	26	✓
pONYK-TCiA	68	✓	68	✓	68	✓
pONYK-ATC	124	✓	124	✓	124	✓

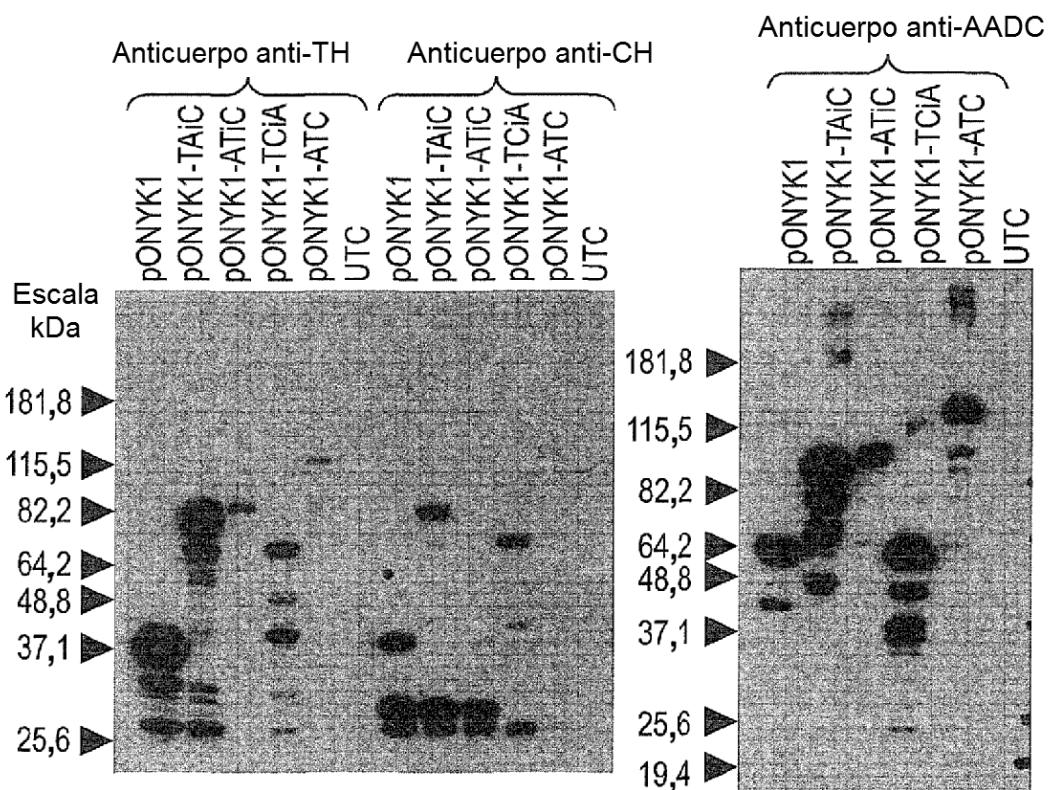


FIG. 4

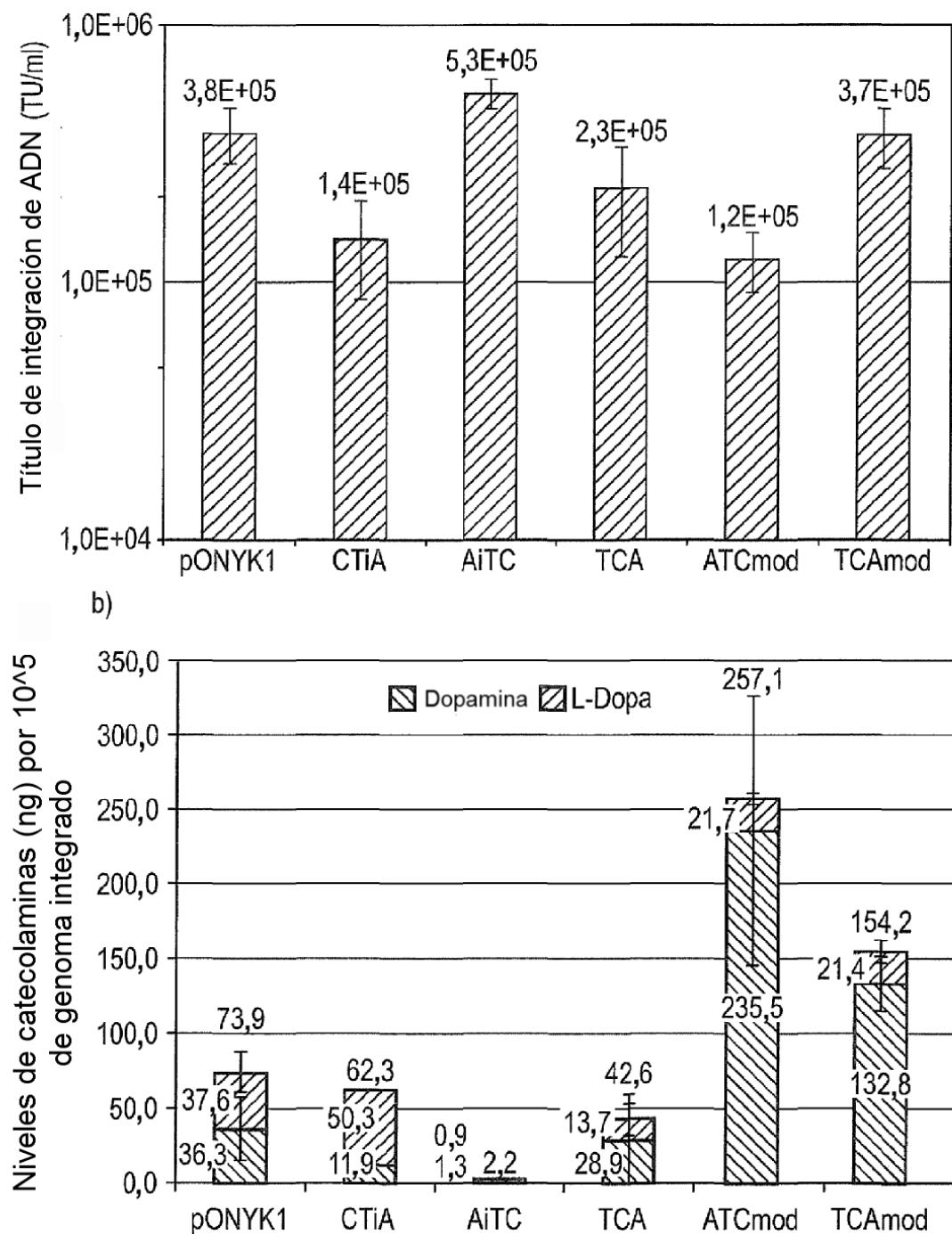
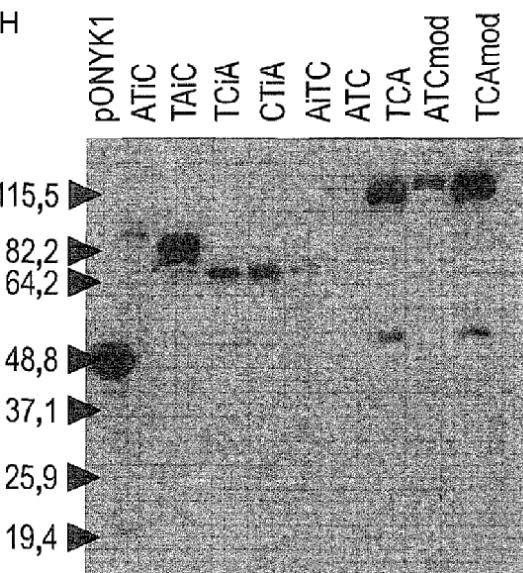


FIG. 5

a) Análisis de transferencia de Western de TH

Tamaños esperados de proteína TH

Genoma de EIAV	kDa	Resultado
pONYK1	42	✓
pONYK-ATiC	98	✓
pONYK-TAiC	98	✓
pONYK-TCiA	68	✓
pONYK-CTiA	68	✓
pONYK-AiTC	68	
pONYK-ATC	124	✓
pONYK-TCA	124	✓
pONYK-ATCmod	124	✓
pONYK-TCAmmod	124	✓



b) Transferencia de Western de CH1

Tamaños esperados de proteína CH1

Genoma de EIAV	kDa	Resultado
pONYK1	26	✓
pONYK-ATiC	26	✓
pONYK-TAiC	26	✓
pONYK-TCiA	68	✓
pONYK-CTiA	68	✓
pONYK-AiTC	68	✓
pONYK-ATC	124	✓
pONYK-TCA	124	✓
pONYK-ATCmod	124	✓
pONYK-TCAmmod	124	✓

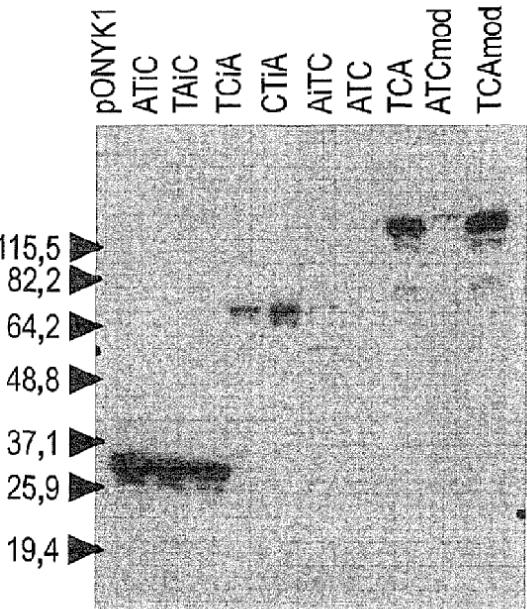


FIG. 6

c) Análisis de transferencia de Western de AADC

Tamaños esperados de proteína AADC

Genoma de EIAV	kDa	Resultado
pONYK1	56	✓
pONYK-ATiC	98	✓
pONYK-TAiC	98	✓
pONYK-TCiA	56	✓
pONYK-CTiA	56	✓
pONYK-AiTC	56	✓
pONYK-ATC	124	✓
pONYK-TCA	124	✓
pONYK-ATCmod	124	✓
pONYK-TCAmod	124	✓

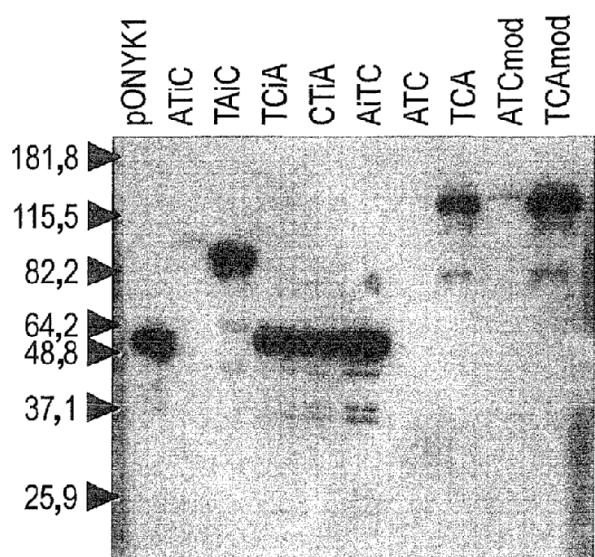


FIG. 6 (continuación)

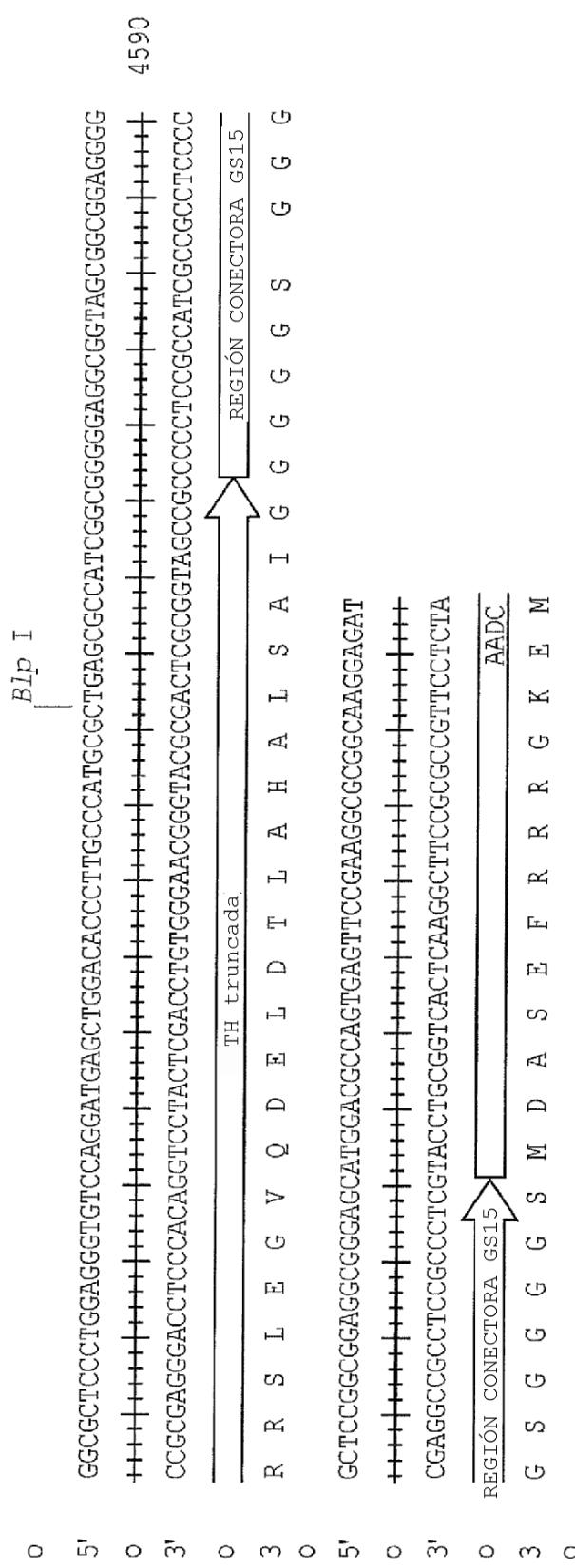
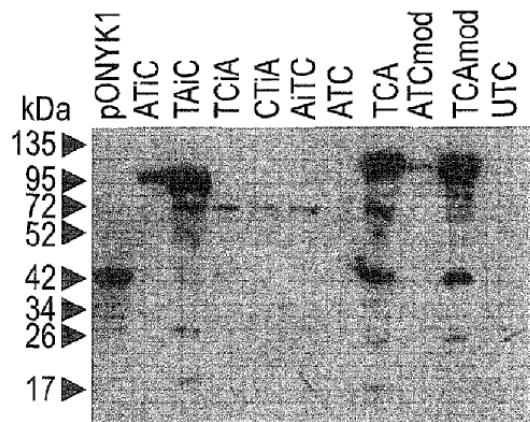


FIG. 7

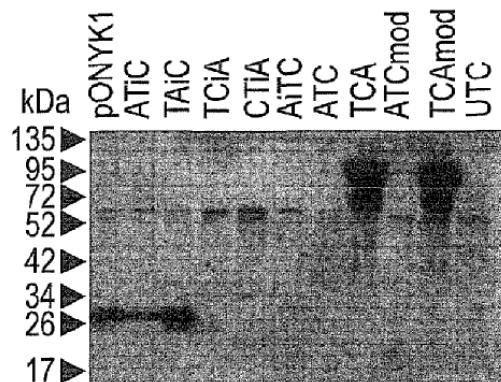
a) Análisis de transferencia de Western de TH

Genoma de EIAV	Tamaño esperado (kDa)	Resultado
pONYK1	42	✓
ATiC	98	✓
TAiC	98	✓
TCiA	68	✓
CTiA	68	✓
AiT C	68	✓
ATC	124	✓ Muy débil
TCA	124	✓
ATCmod	124	✓ Débil
TCAmod	124	✓
No transducido (UTC)	N/A	✓



b) Análisis de transferencia de Western de CH1

Genoma de EIAV	Tamaño esperado (kDa)	Resultado
pONYK1	26	
ATiC	26	
TAiC	26	
TCiA	68	? *
CTiA	68	? *
AiT C	68*	? *
ATC	124	✓ Débil
TCA	124	✓
ATCmod	124	✓ Débil
TCAmod	124	124
No transducido (UTC)	N/A	✓



a) Análisis de transferencia de Western de AADC

Genoma de EIAV	Tamaño esperado (kDa)	Resultado
pONYK1	56	✓
ATiC	98	✓ Débil
TAiC	98	✓
TCiA	56	✓ Débil
CTiA	56	✓ Débil*
AiT C	56	? *
ATC	124	X No detectado
TCA	124	✓
ATCmod	124	X No detectado
TCAmod	124	✓
No transducido (UTC)	N/A	✓

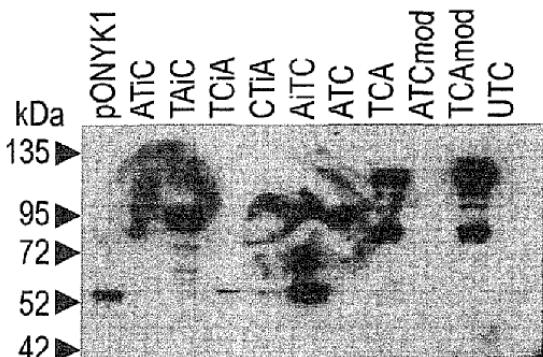


FIG. 8

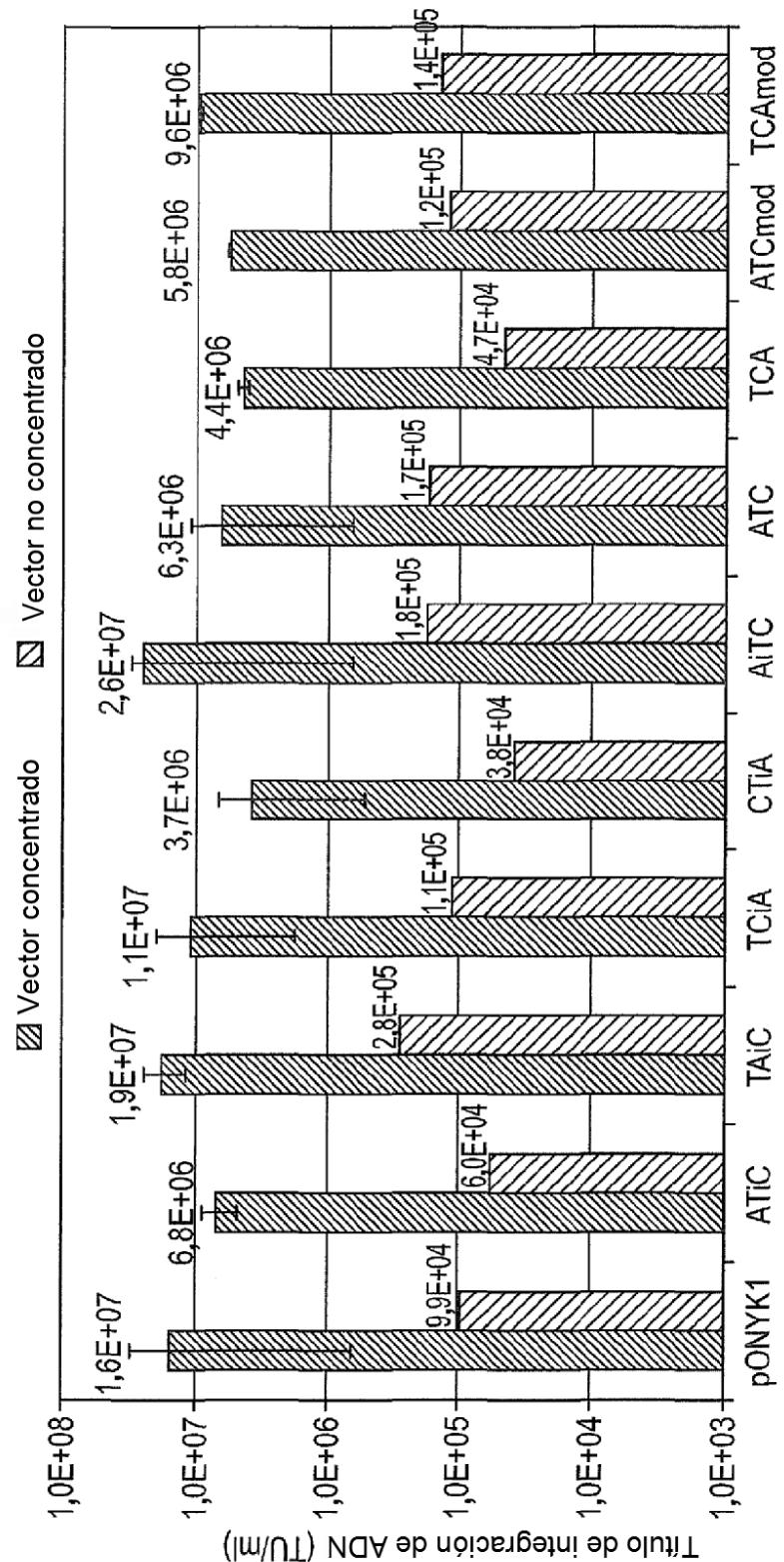
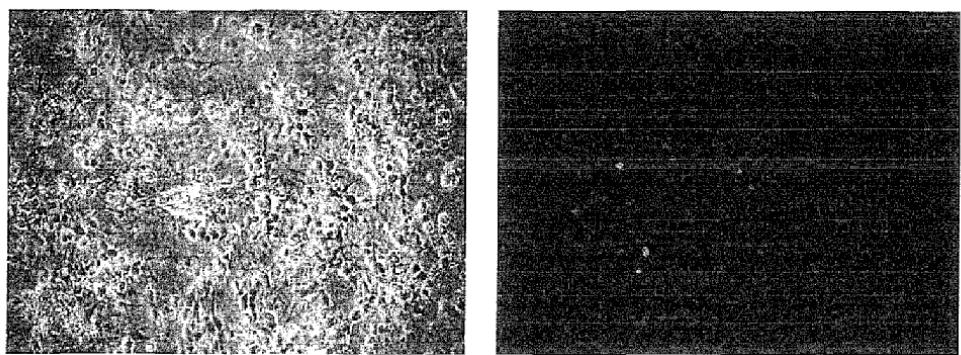


FIG. 9

a)



b)

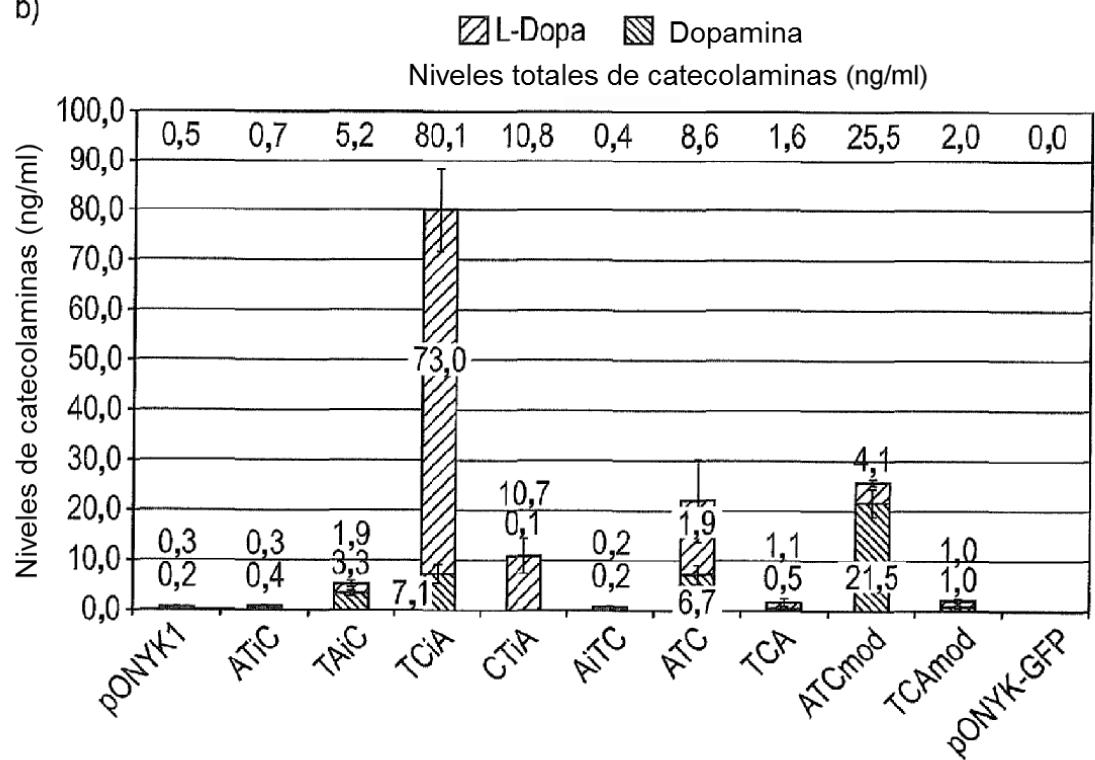


FIG. 10

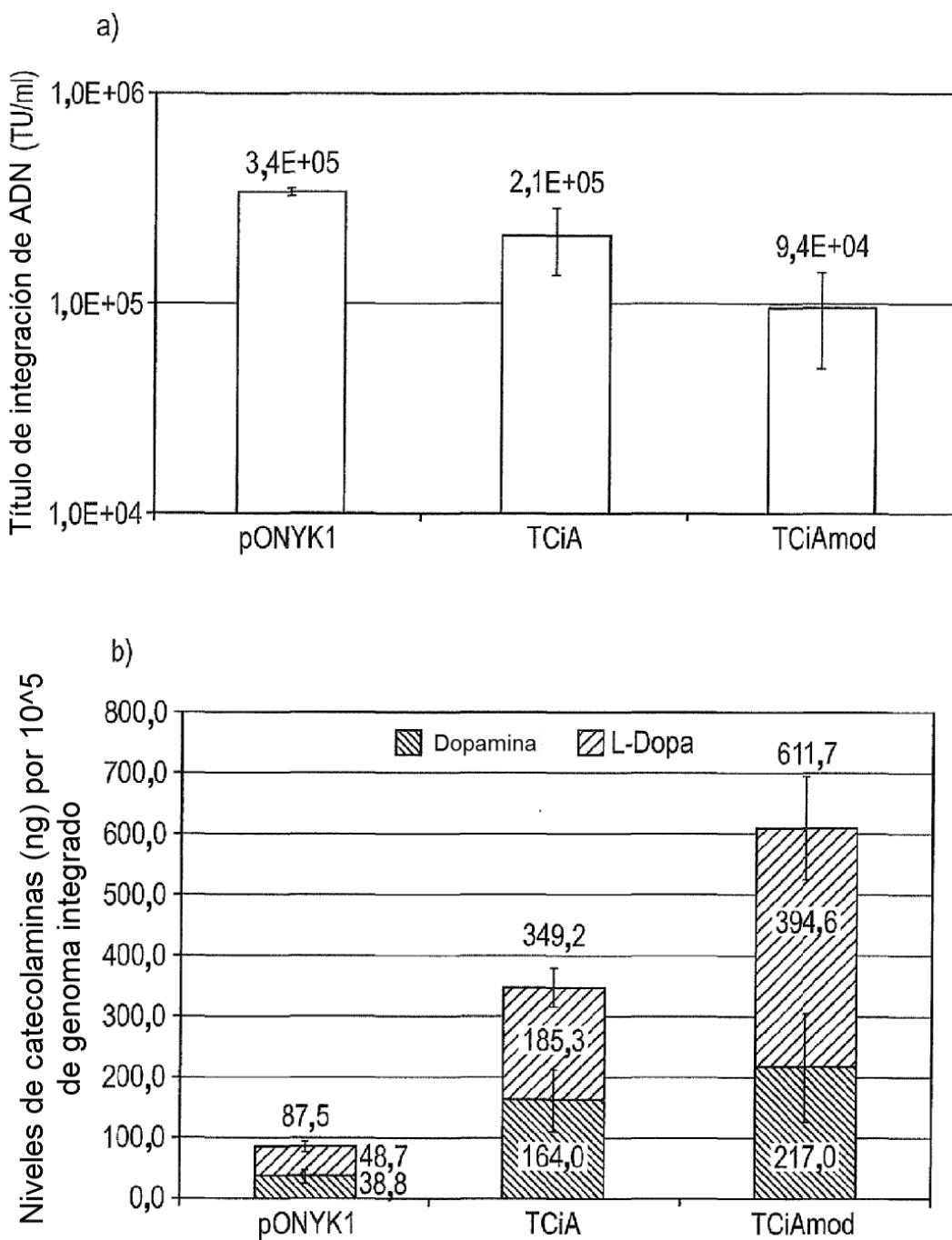
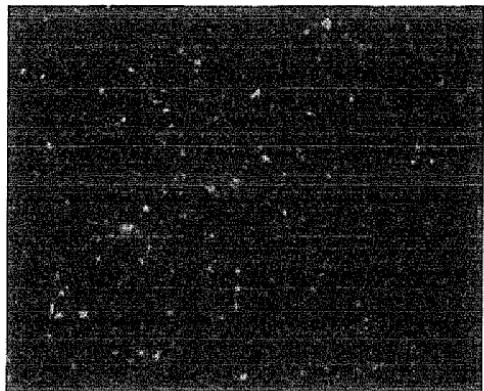


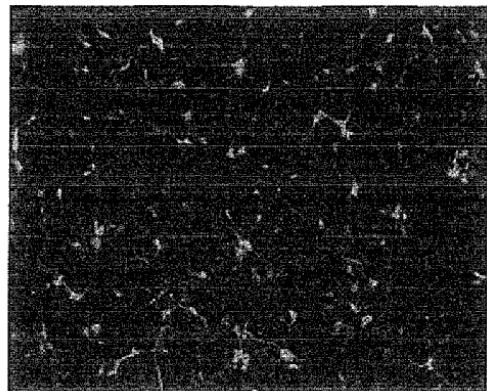
FIG. 11

a)

EIAV-GFP MOI 2



EIAV-GFP MOI 10



b)

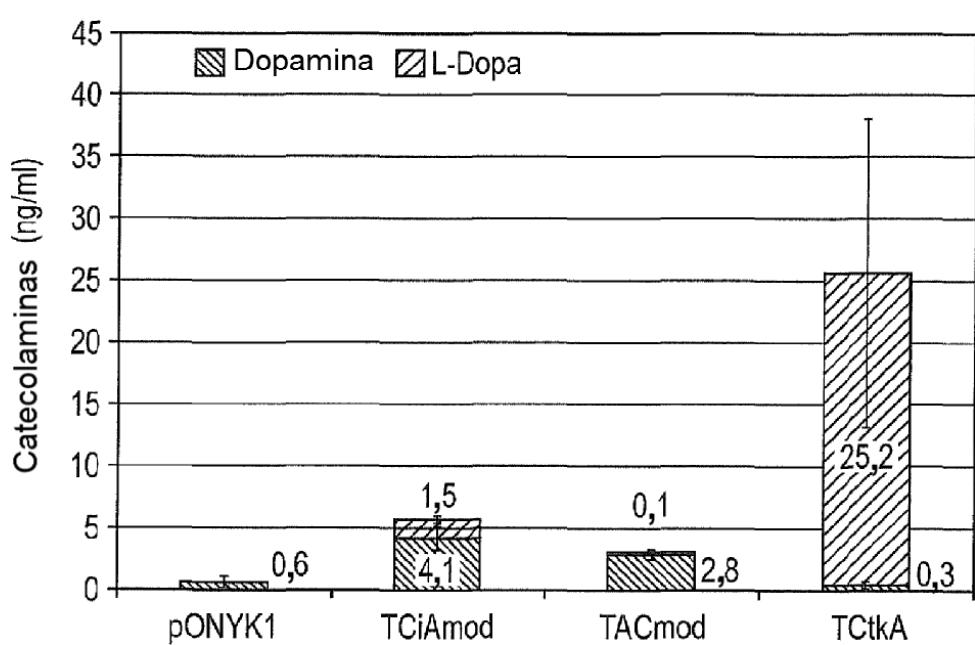
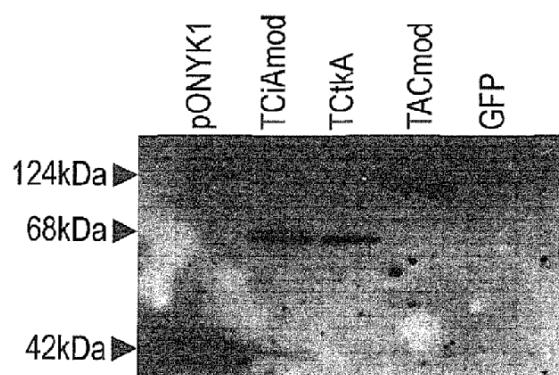


FIG. 12

a) Transferencia de Western de TH

Vector	Tamaño esperado (kDa)	Resultado
pONYK1	42	✓
TCiAmod	68	✓
TCtkA	68	✓
TACmod	124	✓
GFP	N/A	



b) Transferencia de Western de AADC

Vector	Tamaño esperado (kDa)	Resultado
pONYK1	56	✓
TCiAmod	56	✓
TCtkA	56	✓ Muy débil
TACmod	124	✓
GFP	N/A	

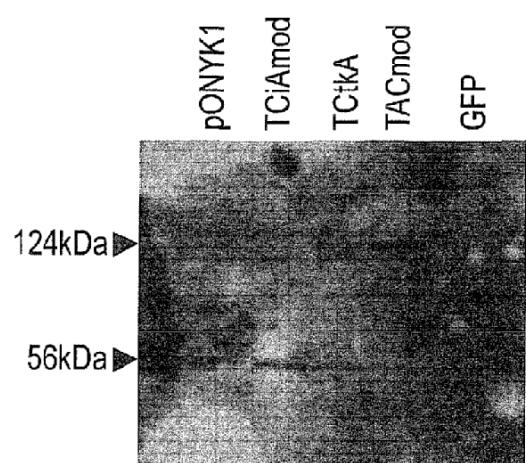


FIG. 13

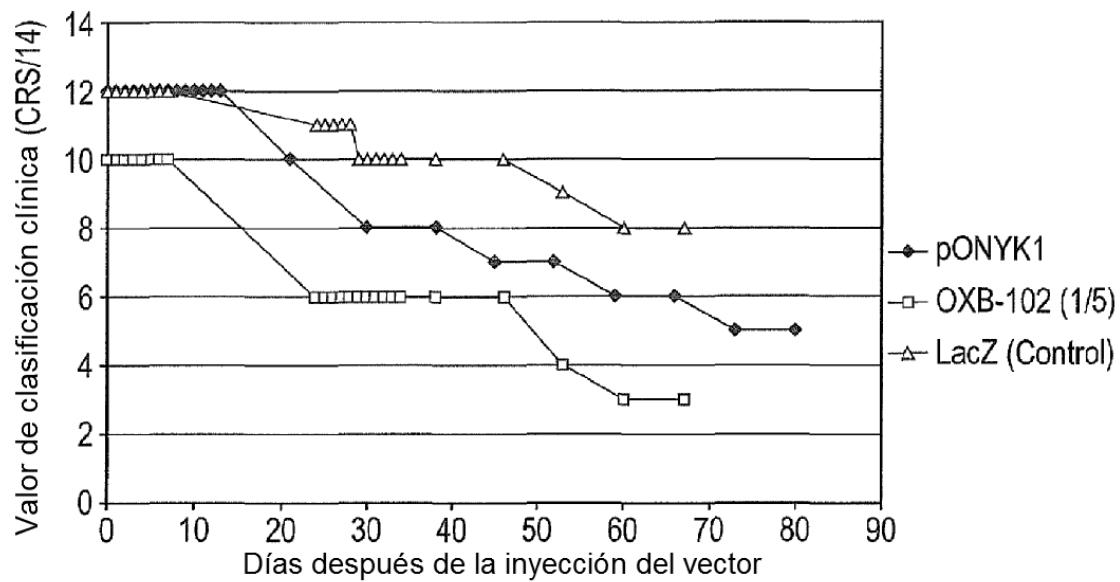


FIG. 14

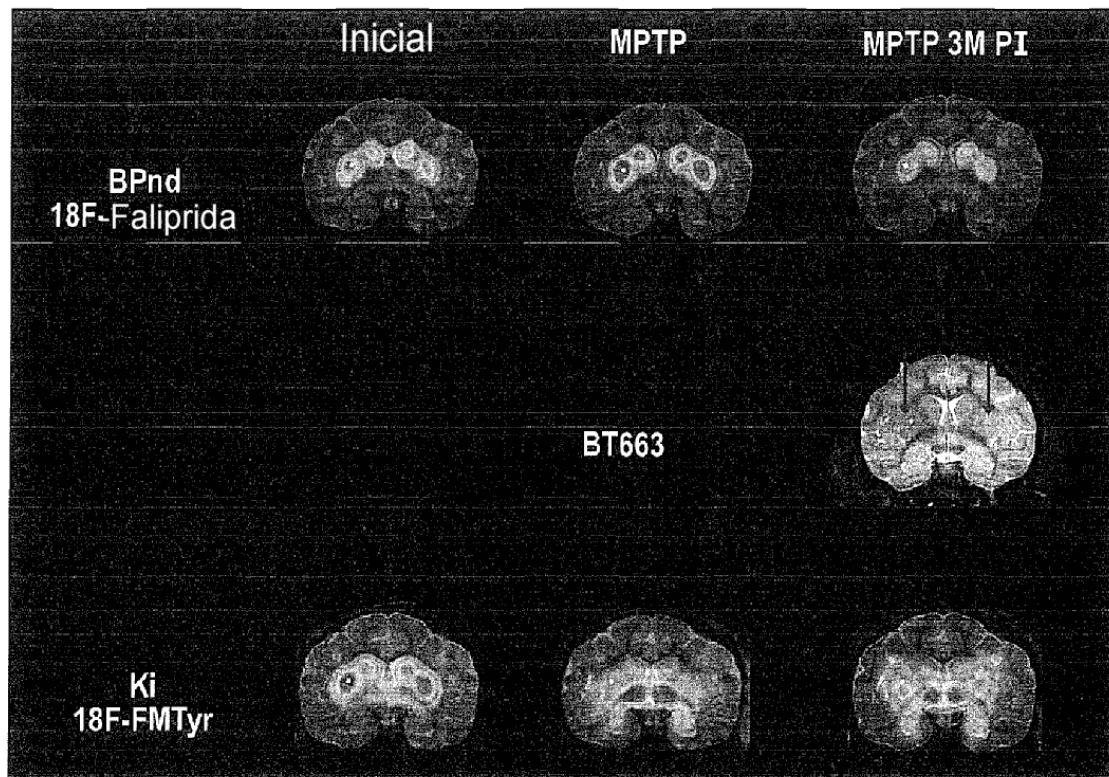


FIG. 15