



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 288 993**

51 Int. Cl.:

C12N 15/864 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C07K 14/50 (2006.01)

C07K 14/52 (2006.01)

C07K 14/515 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01974582 .7**

86 Fecha de presentación : **17.08.2001**

87 Número de publicación de la solicitud: **1311699**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **21.05.2003**

54

Título: **Distribución de factores angiogénicos mediada por virus adenoasociados.**

30

Prioridad: **17.08.2000 US 226056 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.02.2008

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.02.2008

73

Titular/es: **Keiya Ozawa**
3311-1 Yakushiji, Minimikawachi-machi
Kawachi-gun, Tochigi 329-0498, JP
Masahisa Shimpo;
Uichi Ikeda;
Yoshikazu Maeda y
Kazuyuki Shimada

72

Inventor/es: **Ozawa, Keiya;**
Shimpo, Masahisa;
Ikeda, Uichi;
Maeda, Yoshikazu y
Shimada, Kazuyuki

74

Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 288 993 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

Distribución de factores angiogénicos mediada por virus adenoasociados.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a la distribución de viriones recombinantes de virus adenoasociados a tejido muscular. Más específicamente, la invención se refiere a la distribución de viriones AAVr que contienen un transgén que codifica un factor angiogénico a músculo isquémico y no isquémico. La invención también se refiere al tratamiento de enfermedades isquémicas.

Antecedentes de la invención

La arteriopatía coronaria es la causa más común de insuficiencia cardíaca en el mundo occidental. En los Estados Unidos, alrededor de 7 millones de personas sufren la enfermedad, con más de 500.000 personas que mueren de la misma cada año, lo que hace de la arteriopatía coronaria el asesino número uno de hombres y mujeres en América. Además, aproximadamente otros 700.000 americanos más experimentan ataques de corazón no fatales, con una morbilidad significativa una consecuencia clínica común, ya que con frecuencia produce daño cardíaco irreparable. Este daño al tejido cardíaco está causado por la isquemia. La isquemia de miocardio se produce cuando el músculo cardíaco deja de recibir un suministro adecuado de sangre y se le priva así de los niveles esenciales de oxígeno y nutrientes. Si el estado hipóxico e hiponutricional posterior no se corrige, se producirá necrosis del tejido cardíaco; es decir, evolucionará a infarto de miocardio, y si es lo suficientemente grave, se producirá un paro cardíaco.

La causa más frecuente de la isquemia cardíaca, la aterosclerosis, resulta del estrechamiento y endurecimiento de las arterias coronarias que proporcionan el flujo sanguíneo al músculo cardíaco. El estrechamiento y endurecimiento puede llegar a ser lo suficientemente inexorable para bloquear completamente la arteria afectada. Otros factores conocidos que causan oclusión de la arteria coronaria incluyen tromboembolias (en ausencia de aterosclerosis) y anomalías anatómicas congénitas.

Las estrategias terapéuticas actuales para la isquemia de miocardio incluyen la intervención farmacológica, cirugía de revascularización coronaria, y técnicas endovasculares no quirúrgicas (por ejemplo, angioplastia transluminal percutánea, stents endovasculares). La terapia farmacológica estándar se basa en estrategias que implican aumentar el suministro de sangre al músculo cardíaco o disminuir la demanda de oxígeno y nutrientes por parte del músculo cardíaco. El tratamiento quirúrgico de la cardiopatía isquémica se basa en la derivación los segmentos enfermos de la arteria con injertos de revascularización estratégicamente situados. Las técnicas endovasculares no quirúrgicas se basan en el uso de catéteres o stents para reducir el estrechamiento en las arterias coronarias enfermas. Todas estas estrategias se usan para reducir el número de, o eliminar, los episodios isquémicos, pero todas tienen varias limitaciones. La necesidad de desarrollar estrategias terapéuticas más efectivas se basa parcialmente en el hecho de que las víctimas supervivientes de episodios isquémicos tienen sustancialmente mayor riesgo para episodios posteriores de isquemia, lo que en muchos casos ha demostrado ser fatal.

Además de en el corazón, la isquemia puede ocurrir en el cerebro, las extremidades, pulmones, y riñones, produciendo ictus, trombosis venosa profunda, émbolos pulmonares e insuficiencia renal. La arteriopatía periférica (es decir, isquemia no miocárdica) afecta aproximadamente a 8-10 millones de personas en los Estados Unidos. Con frecuencia produce neuropatías periféricas, donde las neuronas sensoriales y motoras están negativamente afectadas. El pronóstico de los pacientes con estos factores de riesgo es limitado debido a sus riesgos mayores de infarto de miocardio, ictus y muerte cardiovascular. Con frecuencia es necesario tratar juntas la isquemia periférica y miocárdica.

Muchas estrategias terapéuticas nuevas para tratar la enfermedad isquémica se centran en estimular el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos, un proceso conocido como angiogénesis. La angiogénesis, o la proliferación de nuevos vasos sanguíneos capilares, es un proceso fundamental necesario para el crecimiento y desarrollo normales de los tejidos. Es un requerimiento para el desarrollo y diferenciación del árbol vascular, así como para una gran variedad de otros procesos fisiológicos. Entre estos, la angiogénesis se produce como una parte de los mecanismos de reparación del cuerpo, por ejemplo, en la curación de heridas.

Los vasos sanguíneos capilares consisten en células endoteliales y pericitos. Estos dos tipos de células llevan la información genética indispensable para formar tubos, ramas y redes enteras de capilares. Moléculas específicas pueden iniciar este proceso. En vista de la importancia fisiológica de la angiogénesis, se ha dedicado mucho esfuerzo al aislamiento, caracterización y purificación de factores que pueden estimular la angiogénesis, y se han purificado y caracterizado un número de polipéptidos que lo hacen.

Uno de esos factores angiogénicos, que específicamente se une y activa células endoteliales vasculares, es el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). El VEGF es una proteína vasoactiva potente. Se han descrito cuatro variantes moleculares diferentes del VEGF. La variante de 165 aminoácidos es la forma molecular predominante que se encuentra en células y tejidos normales. También se conocen una forma menos abundante, más corta con una delección de 44 aminoácidos entre las posiciones 116 y 159 (VEGF₁₂₁), una forma más larga con una inserción de 24 residuos básicos en la posición 116 (VEGF₁₈₉), y otra forma más larga con una inserción 41 aminoácidos (VEGF₂₀₆), que incluye la inserción de 24 aminoácidos encontrada en VEGF₁₈₉. VEGF₁₂₁ y VEGF₁₆₅ son proteínas

solubles. VEGF₁₈₉ y VEGF₂₀₆ parecen estar mayoritariamente asociadas a células. Todas las versiones de VEGF son biológicamente activas.

Las distintas formas de VEGF están codificadas por el mismo gen y se producen mediante ajuste alternativo del ARN mensajero. Esta conclusión está respaldada por análisis de Southern blot de ADN genómico humano, que muestra que el patrón de restricción es idéntico utilizando una sonda para VEGF₁₆₅ o una que contiene la inserción en VEGF₂₀₆. El análisis de clones genómicos en el área putativa del ayuste del ARNm también muestra una estructura intrón/exón consistente con el ayuste alternativo. Recientemente, se ha descrito una nueva isoforma de VEGF, denominada VEGF-2. Su perfil de expresión es similar a VEGF, y también se ha demostrado que estimula la proliferación de células endoteliales vasculares, mientras que inhibe el efecto estimulante de la proliferación en células vasculares de músculo liso provocado por el factor de crecimiento derivado de plaquetas.

VEGF puede tener diferentes efectos que dependen del contexto biológico específico en que se encuentra. VEGF es un potente mitógeno para células endoteliales y contribuye directamente a la inducción de la angiogénesis *in vivo* promoviendo la proliferación de células endoteliales durante el desarrollo normal o durante la curación de heridas. Una de las propiedades más notables de VEGF es su especificidad. Es mitogénico *in vitro* a 1 ng/ml para células endoteliales de capilares y venas umbilicales humanas, pero no para células de corteza adrenal, células epiteliales de la córnea o el cristalino, células vasculares de músculo liso, células endoteliales de la córnea, células de la granulosa, queratinocitos, fibroblastos BHK-21, células 3T3, fibroblastos embrionarios de rata, fibroblastos de placenta humana y células de sarcoma humano. La especificidad de células diana de VEGF parece estar restringida a células endoteliales vasculares. Mediante unión a su receptor (un receptor tirosina quinasa de la superficie de las células endoteliales), VEGF puede inducir una secuencia de sucesos que producen angiogénesis y se ha demostrado que estimula el crecimiento de capilares en varios modelos animales de isquemia. Es capaz de estimular la proliferación de células endoteliales aisladas de vasos pequeños y grandes. La expresión de VEGF está desencadenada por la hipoxemia de modo que la proliferación de células endoteliales y la angiogénesis parecen estar específicamente estimuladas en áreas isquémicas.

Otro factor angiogénico que se ha caracterizado relativamente bien es el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). Existen al menos nueve miembros de la familia de FGF, esto es de FGF-1 (denominado alternativamente FGF ácido) hasta FGF-9, de los cuales no todos están asociados con la angiogénesis. FGF-2, también conocido como FGF básico, es una de las proteínas más extensamente caracterizadas en el proceso de angiogénesis. Por ejemplo, se ha mostrado en estudios que la inyección de FGF-2 en arterias coronarias caninas adultas durante la oclusión coronaria produce un aumento en la formación de nuevos vasos sanguíneos, produciendo según se informa un descenso en la disfunción del miocardio. Se ha informado de resultados similares en otros modelos animales de la isquemia miocárdica. En ensayos basados en células, se ha mostrado que FGF-2 tiene un efecto sinérgico con VEGF para inducir proliferación de células endoteliales en estructuras similares a capilares. *In vivo*, se ha mostrado que FGF-2, junto con VEGF, induce angiogénesis. El receptor de FGF es similar al receptor de VEGF en que es un receptor tirosina quinasa de la superficie celular. La unión del ligando activa el receptor induciendo un cambio conformacional que resulta en el desencadenamiento de la actividad tirosina quinasa, que produce una cascada de transducción de señales que afecta a la expresión génica y resulta por último en la proliferación de células endoteliales.

La angiopoyetina-1, un factor angiogénico recientemente descubierto, se identificó por primera vez debido a su implicación en los estadios tardíos de la angiogénesis. Por ejemplo, hay estudios que muestran que, cuando se añaden VEGF y angiopoyetina-1 juntos en un ensayo angiogénico, se forman vasos mayores, más numerosos y más ramificados respecto al tratamiento con VEGF solo. Otro estudio mostró que la angiopoyetina-1 indujo proliferación de células endoteliales y crecimiento de capilares en ausencia de VEGF, y que estos nuevos vasos sanguíneos no eran "porosos", a diferencia del VEGF, que indujo la formación de nuevos vasos sanguíneos que eran porosos. El mismo estudio demostró que la coexpresión de VEGF y angiopoyetina-1 producía un efecto aditivo en la formación de nuevos vasos sanguíneos, y que estos nuevos vasos sanguíneos no eran porosos.

Un prerrequisito para alcanzar un efecto angiogénico con estas proteínas sin embargo, ha sido la necesidad de distribución de la proteína repetida o a largo plazo, que limita la utilidad de inyectar directamente estas proteínas para estimular la angiogénesis en el ámbito clínico. Por lo tanto, una aproximación que no depende de las inyecciones o la infusión repetidas de factores angiogénicos, que permitiría niveles de expresión de factores angiogénicos a largo plazo y continuos, y alcanzaría conclusiones terapéuticas definidas, proporcionaría beneficios potenciales en el tratamiento de enfermedades isquémicas. Actualmente se desarrollan varios métodos de terapia génica para alcanzar este fin.

Idealmente, tales métodos de terapia génica permitirán la distribución de niveles continuos de proteínas específicas (u otras moléculas terapéuticas) al paciente. Se puede introducir una molécula de ácido nucleico directamente en un paciente (terapia génica *in vivo*), o en células aisladas de un paciente o un donante, que posteriormente se devuelven al paciente (terapia génica *ex vivo*). El ácido nucleico introducido dirige entonces las células propias del paciente o las células injertadas para producir el producto terapéutico deseado. La terapia génica puede también permitir a los médicos seleccionar órganos específicos o dianas celulares (por ejemplo, músculo, células sanguíneas, células cerebrales, etc.) para la terapia.

Los ácidos nucleicos se pueden introducir en las células de un paciente de diversas maneras, incluyendo métodos de distribución de genes mediada por virus, de distribución de ADN desnudo, y de transfección. Los virus recombinantes más comúnmente usados en ensayos de terapia génica (así como en investigación preclínica) son aquellos basados en retrovirus, adenovirus, virus del herpes, poxvirus, y virus adenoasociados (AAV). Alternativamente, se pueden

utilizar métodos de transfección para la distribución de genes. Aunque los métodos de transfección generalmente no son adecuados para la distribución de genes *in vivo*, se pueden utilizar para la transferencia de genes *ex vivo*. Tales métodos incluyen métodos químicos de transfección, como precipitación con fosfato cálcico y transfección mediada por liposomas, así como métodos físicos de transfección como la electroporación.

Terapia génica mediada por AAV

AAV, un parvovirus que pertenece al género Dependovirus, tiene varias características que no se encuentran en otros virus. Estas características lo hacen particularmente adecuado para aplicaciones de terapia génica. Por ejemplo, AAV puede infectar un amplio rango de células huésped, incluyendo células que no se dividen. Además, AAV puede infectar células de una diversidad de especies. De forma importante, AAV no se ha asociado a ninguna enfermedad humana o animal, y no parece alterar las propiedades fisiológicas de la célula huésped tras la transducción. Finalmente, AAV es estable en un intervalo amplio de condiciones físicas y químicas, lo que le hace apto para los requerimientos de producción, almacenamiento y transporte.

El genoma del AAV, una molécula lineal de ADN de cadena sencilla que contiene aproximadamente 4700 nucleótidos (el genoma de AAV-2 consta de 4681 nucleótidos, el genoma de AAV-4 de 4767), generalmente comprende un segmento interno no repetido flanqueado en cada extremo por repeticiones terminales invertidas (RTIs). Las RTIs tienen aproximadamente 145 nucleótidos de longitud (AAV-1 tiene RTIs de 143 nucleótidos) y tienen múltiples funciones, incluyendo servir de orígenes de replicación, y como señales de empaquetamiento para el genoma viral.

La parte interna no repetida del genoma incluye dos marcos abiertos de lectura (ORFs) extensos, conocidos como las regiones de replicación (*rep*) y cápsida (*cap*) de AAV. Estas ORFs codifican productos génicos de replicación y cápsida, que permiten la replicación, ensamblaje y empaquetamiento de un virión AAV completo. Más específicamente, una familia de al menos cuatro proteínas virales se expresan de la región *rep* de AAV: Rep 78, Rep 68, Rep 52 y Rep 40, las cuales se nombran por su peso molecular aparente. La región *cap* de AAV codifica al menos tres proteínas: VP1, VP2 y VP3.

AAV es un virus dependiente de un ayudante, esto es, requiere la coinfección con un virus ayudante (por ejemplo, adenovirus, herpesvirus o virus de la vacuna) para formar viriones AAV funcionalmente completos. En ausencia de coinfección con un virus ayudante, AAV establece un estado latente en el que el genoma viral se inserta en un cromosoma de la célula huésped o existe en forma episomal, pero no se producen viriones infecciosos. La infección posterior con un virus ayudante “rescata” el genoma integrado, permitiendo que se replique y se empaquete en cápsidas virales, reconstituyendo de este modo el virión infeccioso. Mientras que AAV puede infectar células de diferentes especies, el virus ayudante debe ser de la misma especie que la célula huésped. Así, por ejemplo, el AAV humano se replicará en células caninas que se han coinfectado con un adenovirus canino.

Para producir AAV recombinantes (AAVr) infecciosos que contienen una secuencia heteróloga de ácido nucleico, se puede transfectar una línea celular huésped adecuada con un vector AAV que contiene la secuencia heteróloga de ácido nucleico, pero a la que le faltan los genes de función ayudante de AAV, *rep* y *cap*. Los genes de función ayudante de AAV se pueden proporcionar después en un vector separado. Los genes del virus ayudante necesarios para la producción de AAV (es decir, los genes de función accesoria) se pueden proporcionar en un vector, mejor que proporcionar un virus ayudante competente para replicación (tal como adenovirus, herpesvirus, o vacuna). Alternativamente, las funciones ayudantes de AAV se pueden incorporar al genoma de un virus ayudante, preferiblemente uno que se ha hecho incompetente para replicación. Por ejemplo, el *cap* de AAV se puede incorporar en un genoma de adenovirus como el adenovirus de serotipo 5, y el adenovirus puede entonces infectar las células huésped y proporcionar la función ayudante de la proteína Cap así como las funciones accesorias del virus ayudante.

Colectivamente, los genes de función ayudante de AAV (es decir, *rep* y *cap*) y los genes de funciones accesorias se pueden proporcionar en uno o más vectores. Los productos de genes con función ayudante y accesoria se pueden expresar entonces en la célula huésped donde actuarán *in trans* sobre los vectores AAVr que contienen la secuencia heteróloga de ácido nucleico. El vector AAVr que contiene la secuencia heteróloga de ácido nucleico se replicará después y se empaquetará como si fuera un genoma de AAV salvaje (wt), formando un virión recombinante. Cuando las células de un paciente son infectadas con los viriones AAVr resultantes, la secuencia heteróloga de ácido nucleico entra y se expresa en las células del paciente. Dado que las células del paciente carecen de los genes *rep* y *cap*, así como de los genes de funciones accesorias, los AAVr no se pueden replicar y empaquetar sus genomas más allá. Además, sin una fuente de genes *rep* y *cap*, los AAVwt no se pueden formar en las células del paciente.

Existen seis serotipos conocidos de AAV, de AAV-1 hasta AAV-6. AAV-2 es el serotipo más frecuente en poblaciones humanas; un estudio estimó que al menos el 80% de la población general se ha infectado con AAV-2. AAV-3 y AAV-5 también son frecuentes en poblaciones humanas, con tasas de infección de hasta el 60%. AAV-1 y AAV-4 se han aislado de simios, aunque ambos serotipos pueden transducir células humanas. De los seis serotipos conocidos, AAV-2 es el mejor caracterizado. Por ejemplo, AAV-2 se ha utilizado en un amplio espectro de experimentos de transducción *in vivo*, y se ha visto que puede transducir muchos tipos de tejidos diferentes. Los investigadores han explotado este amplio tropismo de tejidos de AAV-2 para distribuir muchos transgenes específicos de tejido.

La necesidad de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas para tratar distintas enfermedades isquémicas es evidente por el número de individuos que sufren dichos trastornos. La arteriopatía coronaria que evoluciona a isquemia

y posterior infarto de miocardio es la primera causa de muerte entre los adultos en el mundo occidental. Estimular el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) para producir un aumento del flujo sanguíneo en los tejidos privados de oxígeno es una de dichas estrategias terapéuticas nuevas para reducir el número de infartos de miocardio. Para vencer las limitaciones inherentes en las técnicas experimentales actuales utilizadas para estimular la angiogénesis (por ejemplo, bajos niveles de expresión transitoria con plásmidos de ADN, o inflamación potencial con adenovirus), se han desarrollado métodos que utilizan AAV para distribuir factores angiogénicos a los tejidos isquémicos y se describen aquí.

Compendio de la invención

Según la presente invención, se proporciona un uso que permite la transferencia eficiente de genes a tejido muscular utilizando viriones recombinantes AAV. Los métodos dan como resultado una expresión estable y a largo plazo de los genes transferidos.

Utilizar viriones AAVr que carecen de los viriones AAV salvajes (wt) y de los virus ayudantes (tales como adenovirus) facilita una transferencia de genes segura y eficiente. De acuerdo con esto, la invención abarca extensamente el uso de viriones AAVr, libres de AAVwt y adenovirus (u otros virus ayudantes), para distribuir genes que codifican factores angiogénicos a tejido muscular para producir un efecto terapéutico, esto es, tratamiento o prevención de arteriopatías coronarias y afecciones isquémicas. En una forma de realización de la presente invención, el factor angiogénico es VEGF. En una forma de realización preferida, VEGF es VEGF₁₆₅. En otra forma de realización, el factor angiogénico es FGF. En aún otra forma de realización, el factor angiogénico es angiopoyetina-1. El efecto terapéutico, en un aspecto de la invención, es un aumento en la formación de nuevos vasos sanguíneos. En otro aspecto, el efecto terapéutico es un aumento del flujo sanguíneo.

Para facilitar el crecimiento de los vasos sanguíneos nuevos y aumentar el flujo sanguíneo al músculo, es necesario distribuir los genes de factores angiogénicos al músculo, y de tal manera que se alcance una expresión génica eficiente. De acuerdo con esto, la distribución del virión AAVr se realiza mediante inyección directa en el tejido muscular. En un aspecto, el tejido muscular es tejido muscular esquelético. En otro aspecto, el tejido muscular es tejido muscular cardiaco. En otro aspecto, el tejido muscular es tejido muscular liso.

Para tratar la enfermedad isquémica, los viriones AAVr, libres de AAVwt y virus ayudantes y que contienen un gen que codifica un factor angiogénico, se distribuyen al tejido muscular donde el gen se expresa y se alcanza el efecto terapéutico. En un aspecto, el factor angiogénico es VEGF, preferiblemente VEGF₁₆₅. En otro aspecto, el factor angiogénico es FGF. En otro aspecto, el factor angiogénico es angiopoyetina-1. El efecto terapéutico, en un aspecto, es un aumento en la formación de vasos sanguíneos nuevos. En otro aspecto, el efecto terapéutico es un aumento en el flujo sanguíneo al tejido muscular isquémico.

El crecimiento de vasos sanguíneos nuevos y el aumento del flujo sanguíneo se producen cuando los genes de factores angiogénicos llegan al lugar apropiado, y se logra de tal manera que se alcanza una expresión génica adecuada. De acuerdo con esto, el tratamiento de la isquemia en un músculo es mediante inyección directa de viriones AAVr, que contienen un gen que codifica un factor angiogénico, en el músculo que sufre la isquemia. En un aspecto, el músculo es un músculo esquelético. En otro aspecto, el músculo es un músculo cardiaco. En otro aspecto, el músculo es un músculo liso.

Estas y otras formas de realización del objeto de la invención se les ocurrirán fácilmente a los expertos en la materia en vista de lo divulgado aquí.

Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 muestra una inmunotransferencia de miocitos cardiacos de rata transducidos con AAVr-hVEGF₁₆₅. Los miocitos cardiacos se transdujeron con AAVr-hVEGF₁₆₅ o AAVr-LacZ (5×10^3 viriones/célula). Veinticuatro horas después de la transducción, las células se lisaron. La proteína VEGF en el lisado se separó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 7.5% y se transfirió a membranas. La expresión de la proteína VEGF de 42 kDa fue evidente en los miocitos transducidos con AAVr-hVEGF₁₆₅ (carril 2), mientras que no se detectó proteína VEGF en los miocitos transducidos con AAVr-LacZ (carril 3). El carril 1 muestra VEGF₁₆₅ recombinante humana (3 ng/carril) y sirve como control positivo.

La Fig. 2 muestra los resultados de la tinción inmunohistoquímica para VEGF en miocitos cardiacos de rata transducidos. Las células se transdujeron con AAVr-hVEGF₁₆₅ (A) o AAVr-LacZ (B) a 5×10^3 viriones/célula durante 24 h seguido de tinción con un anticuerpo anti-VEGF₁₆₅ humana. Aumento original x100.

La Fig. 3 muestra la concentración de VEGF en el medio de cultivo de miocitos cardiacos de rata. Los miocitos se expusieron a dosis crecientes de AAVr-hVEGF₁₆₅ o de AAVr-LacZ. Cuarenta y ocho horas después de la transducción, la concentración de VEGF se midió mediante ELISA. Los datos se expresan como valores medios \pm SEM (n=4), y son representativos de tres experimentos diferentes.

La Fig. 4 muestra la expresión del ARNm de VEGF en tejido muscular y órganos inyectados con vector. El tejido muscular y los órganos se aislaron a diferentes tiempos tras la inyección intramuscular y se extrajo el ARN total.

Tras tratamiento con Dnasa I, se llevó a cabo una RT-PCR utilizando cebadores específicos para VEGF humano. Los tamaños de los productos de PCR para GAPDH de rata y VEGF humano fueron de 747 bp y 531 bp, respectivamente. Se utilizó un plásmido de expresión de VEGF (pCMV-VEGF) como control positivo. El ARNm de GAPDH sirvió como estándar interno. Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 0.2% teñidos con bromuro de etidio. Tres experimentos independientes dieron resultados idénticos.

La Fig. 5 representa la secreción de VEGF de músculos tibiales anteriores inyectados con AAVr-hVEGF₁₆₅. Diez semanas después de la inyección, el tejido muscular se cortó y se cultivó en medio DMEM/F-12 sin suero. Se utilizó un kit de ELISA para medir la concentración de VEGF en el sobrenadante del cultivo. Las concentraciones de VEGF se normalizaron al contenido de proteína por placa y se muestran valores medios \pm SEM de medidas de un experimento (n=4), representativo de dos experimentos diferentes ($p < 0.05$ comparado con los valores de músculos transducidos con AAVr-LacZ).

La Fig. 6 representa el flujo sanguíneo en las extremidades traseras medido mediante medidores de flujos ultrasónicos de tiempo 6 semanas después de inyección con AAVr-hVEGF₁₆₅. Tras la anestesia, se registró simultáneamente el flujo sanguíneo en las extremidades isquémica y contralateral en ratas del grupo de referencia quirúrgica (n=3), transducidas con AAVr-LacZ (1.5×10^{13} partículas/cuerpo; n=8) y transducidas con AAVr-hVEGF₁₆₅ (2.0×10^{13} partículas/cuerpo; n=8). 6A: Registro representativo del flujo sanguíneo. 6B: Flujo sanguíneo medio en las extremidades isquémicas. Los valores se expresan como % de las extremidades contralaterales y se muestran como valores medios \pm SEM ($p < 0.01$).

La Fig. 7 representa una termografía de las extremidades posteriores de rata realizada 6 semanas después de la inyección con AAVr-hVEGF₁₆₅. Las ratas se anestesiaron y se afeitaron las zonas inferiores del cuerpo. La temperatura de la piel de cada extremidad posterior de las ratas se midió mediante termografía de infrarrojos. 7A: Imágenes de termografía de infrarrojos. R; extremidades isquémicas; L, extremidades contralaterales. 7B: Temperatura media de la piel (°C) de las extremidades posteriores isquémicas y contralaterales en ratas transducidas con AAVr-LacZ (1.5×10^{13} partículas/cuerpo; n=4) o con AAVr-hVEGF₁₆₅ (2.0×10^{13} partículas/cuerpo; n=4) ($p < 0.05$).

Fig. 8. 8A: Imágenes representativas del tejido muscular de rata utilizando tinción histoquímica con fosfatasa alcalina. 8B: Densidad de capilares en tejido muscular de rata. El tejido muscular se obtuvo de extremidades isquémicas de ratas transducidas con AAV-LacZ (n=4) o con AAV-VEGF (n=4). El número de capilares se contó en 5 campos diferentes de una sección muscular, y se calculó la densidad de capilares. Los datos se muestran como valores medios \pm SEM ($p < 0.001$).

35 Descripción detallada de la invención

La invención proporciona métodos para distribuir viriones recombinantes AAV a mamíferos, incluyendo seres humanos. Más particularmente, implica distribución de viriones AAVr que comprenden una secuencia heteróloga de ácido nucleico que codifica un factor angiogénico. Mediante “virión AAV recombinante” o “virión AAVr” se quiere decir un virus infeccioso compuesto de una envuelta proteica de AAV (es decir, una cápsida) que encapsula una secuencia heteróloga de ácido nucleico que está flanqueada por una o más RTIs del AAV. La “secuencia heteróloga de ácido nucleico” encapsulada incluye secuencias de ácido nucleico unidas que normalmente no se encuentran asociadas una a la otra de forma natural. Por ejemplo, una secuencia heteróloga de ácido nucleico podría incluir una secuencia codificante flanqueada por secuencias que no se encuentran asociadas con la secuencia codificante de forma natural. Otra ejemplo de una secuencia heteróloga de ácido nucleico es una secuencia codificante que no se encuentra de forma natural (por ejemplo, secuencias sintéticas que tienen codones diferentes a las del gen natural).

Preferiblemente, los viriones AAV recombinantes se producen utilizando un sistema de transfección triple que se ha descrito en las Patentes de EE.UU. Nos. 6,001,650 y 6,004,797. Este sistema implica el uso de tres vectores para la producción de viriones AAVr, incluyendo un vector con función accesoria, un vector con función ayudante de AAV y un vector AAVr. Los vectores con función accesoria, los vectores con función ayudante de AAV y los vectores AAV recombinantes se pueden preparar utilizando técnicas recombinantes convencionales. Por ejemplo, las moléculas de ácido nucleico se pueden cortar de un genoma viral o de un vector que contiene la misma y ensamblar fácilmente en cualquier orden deseado mediante inserción de una o más de las secuencias de nucleótidos deseadas en una construcción, tales como aquellas disponibles comercialmente de Stratagene, La Jolla, Calif. y otras fuentes que son bien conocidas para los expertos en la materia.

El método de la triple transfección puede hacer uso del vector con función accesoria pladen05 (descrito en la Patente de EE.UU. No. 6,004,797), el vector con función ayudante de AAV pHLP19 (descrito en la Patente de EE.UU. No. 6,001,650), y un vector AAVr que contiene la secuencia heteróloga de ácido nucleico que codifica un factor angiogénico. El experto en la materia apreciará, sin embargo, que las secuencias de ácidos nucleicos codificadas por estos vectores se pueden proporcionar en dos o más vectores en varias combinaciones.

Alternativamente, los viriones AAVr se pueden producir incorporando los genes con funciones accesorias para AAV en el genoma de un virus ayudante tal como el adenovirus de serotipo 5, preferiblemente un virus ayudante que se ha hecho deficiente para replicación, y más preferiblemente uno que se ha hecho incompetente para replicación. Una vez que un gen con función ayudante de AAV, tal como *cap*, se ha incorporado al genoma del virus ayudante, el

virus ayudante, por ejemplo, adenovirus, puede infectar las células huésped y proporcionar la función ayudante de la proteína Cap de AAV así como las funciones accesorias del virus ayudante necesarias.

Según se utiliza aquí, el término “vector” incluye cualquier elemento genético, tal como un plásmido, fago, transposón, cósmido, cromosoma, cromosoma artificial, virus, virión, etc., que es capaz de replicación cuando se asocia con los elementos de control adecuados y que puede transferir secuencias de genes entre células. Así, el término incluye vehículos de clonación y expresión, así como vectores virales.

El vector con función ayudante de AAV codifica las secuencias con “función ayudante de AAV” (es decir, *rep* y *cap*), que funcionan en *trans* para replicación y encapsidación eficaces de AAV. Según se describe en la Patente de EE.UU. No. 6,001,650, el vector con función ayudante de AAV facilita la producción eficiente de viriones AAVr sin generar AAV salvaje o AAV pseudosalvajes detectables; por consiguiente, el sistema de triple transfección permitirá la producción de viriones AAVr sin generar viriones AAV salvajes o pseudosalvajes detectables. Mediante “detectable” se quiere decir la detección de cualquier ADN de AAV salvaje o pseudosalvaje utilizando PCR según se describe en la Patente de EE.UU. No. 6,001,650, *supra*) o técnica equivalente con la misma o similar sensibilidad y especificidad.

El vector con funciones accesorias codifica secuencias de nucleótidos para funciones celulares y/o virales no derivadas de AAV de las que AAV depende para su replicación (es decir, “funciones accesorias”). Las funciones accesorias incluyen aquellas funciones que se requieren para la replicación de AAV, incluyendo, sin limitación, aquellos grupos implicados en la activación de la transcripción de genes de AAV, ajuste específico de estado del ARNm de AAV, replicación del ADN de AAV, síntesis de los productos de expresión de Cap, y ensamblaje de la cápsida de AAV. Las funciones accesorias basadas en virus pueden derivar de cualquiera de los virus ayudantes conocidos tales como adenovirus, herpesvirus (otros que el virus herpes simplex de tipo 1), y el virus de la vacuna. Como resultado, el vector con funciones accesorias facilita la producción eficiente del vector AAV sin utilizar virus ayudante, de modo que los viriones AAVr generados utilizando el sistema de triple transfección estarán libres de adenovirus, herpesvirus, poxvirus, virus de la vacuna, etc.

El “vector AAV” puede ser un vector derivado de cualquier serotipo de AAV, incluyendo sin limitación, AAV-1, AAV-2, AAV-3A, AAV-3B, AAV-4, AAV-5, AAV-6, etc. Los vectores AAV pueden tener uno o más de los genes AAV salvajes deletados enteros o en parte, es decir, los genes *rep* y/o *cap*, pero retienen al menos una secuencia flanqueante RTI funcional, como es necesario para el rescate, replicación y empaquetamiento del virión AAV. Así, un vector AAV se define aquí para incluir al menos aquellas secuencias necesarias en *cis* para la replicación y empaquetamiento viral (por ejemplo, RTIs funcionales). Las RTIs no necesitan tener la secuencia salvaje de nucleótidos, y pueden estar alteradas, por ejemplo, mediante inserción, delección, o sustitución de nucleótidos, con tal que las secuencias aseguren un rescate, replicación y empaquetamiento funcionales. Además, las proteínas ayudantes de AAV, es decir, Rep y Cap, no necesitan provenir del mismo serotipo que las RTIs. Por ejemplo, utilizando técnicas bien conocidas en la técnica, se podría construir un vector usando las RTIs del AAV-2wt, y proporcionar funciones ayudantes (esto es, *rep* y *cap*) de AAV-6wt, o *rep* de AAV-2 y *cap* de AAV-6. Alternativamente, se podrían usar RTIs modificadas basadas en la secuencia de un serotipo de AAVwt particular tal como AAV-2, y las funciones ayudantes de otros setipos de AAV. El experto en la materia puede apreciar la variedad de combinaciones de RTIs y proteínas de funciones ayudantes que se pueden utilizar para construir viriones AAVr intactos y funcionales. Los vectores AAV pueden incluir una o más secuencias heterólogas de ácidos nucleicos flanqueadas con RTIs de AAV funcionales, definiendo la incorporación de secuencias heterólogas de ácidos nucleico un “vector AAVr”.

Los viriones AAV recombinantes se pueden purificar utilizando una variedad de técnicas de purificación que son bien conocidas en la técnica tales como centrifugación por densidad en cloruro de cesio o cromatografía en columna. Una vez purificados, los viriones AAVr se pueden formular en composiciones farmacéuticas estables, por ejemplo según se describe en la Publicación Internacional WO 00/32233, para la distribución a un sujeto mamífero.

La invención contempla la distribución de una o más secuencias de nucleótidos terapéuticas. En particular, la invención abarca vectores AAV que codifican cualquiera de los factores angiogénicos conocidos, factores que se pueden distribuir, utilizando los métodos de la presente invención, a células musculares de un mamífero, incluyendo aquellas de seres humanos. Así, la invención abarca: distribución de VEGF para el tratamiento de isquemia periférica y de miocardio, distribución de FGF para el tratamiento de isquemia periférica y de miocardio, y distribución de angiopoietina-1 para el tratamiento de isquemia periférica y de miocardio. Cada factor angiogénico se puede distribuir solo o en combinación. Por ejemplo, VEGF se puede distribuir solo para estimular la formación de nuevos vasos sanguíneos y aumentar el flujo sanguíneo o VEGF se puede distribuir junto con FGF y/o angiopoietina-1 para estimular la formación de nuevos vasos sanguíneos y aumentar el flujo sanguíneo.

Además, la invención contempla la distribución de cualquiera de las varias formas activas de estos factores angiogénicos. Por ejemplo, según se ha descrito anteriormente, se conocen cuatro variantes de ajuste biológicamente activas de VEGF. Ver por ejemplo, Tischer *et al.*, *J. Biol. Chem.* (1991) 266:11947-11954., que describe la secuencia de VEGF₁₆₅ (ver, también, SEQ ID NOS: 1 y 2 y No. de acceso del GenBank AB021221), VEGF₁₂₁ (ver, también, No. de acceso del GenBank AF214570) y VEGF₁₈₉; y Houck *et al.*, *Mol. Endocrinol.* (1991) 5:1806-1814, que describe la secuencia de VEGF₂₀₆. VEGF₁₆₅ tiene 165 aminoácidos y es la forma molecular predominante que se encuentra en células y tejidos normales. VEGF₁₂₁ es una forma menos abundante, más corta con una delección de 44 aminoácidos entre las posiciones 116 y 159. VEGF₁₈₉ es una forma más larga con una inserción de 24 residuos básicos en la po-

sición 116, y VEGF₂₀₆ es otra forma más larga con una inserción de 41 aminoácidos, que incluye la inserción de 24 aminoácidos que se encuentra en VEGF₁₈₉.

La presente invención también es útil para otros propósitos además de tratar un trastorno isquémico o distribuir factores angiogénicos conocidos a un músculo. Por ejemplo, un gen desconocido que se piensa que puede ser el gen de un factor angiogénico se puede expresar utilizando los métodos descritos aquí. A modo de ejemplo, se puede imaginar que la bioinformática descubra un gen desconocido "X", que tiene un grado alto (por ejemplo, >70%) de identidad de secuencia de nucleótidos con el gen de un factor angiogénico conocido "Y", suficiente para identificar X como el gen de un supuesto factor angiogénico. En este caso, el gen X se podría clonar en un vector AAV, creando de este modo un nuevo vector AAVr-X y, utilizando la presente invención, AAVr-X se podría expresar para determinar si la expresión de X produce la formación de nuevos vasos sanguíneos y/o incremento en el flujo sanguíneo. Lo mismo se puede hacer con Y para determinar si las funciones de X e Y son las mismas o similares. Por lo tanto, la presente invención se puede utilizar para adelantar el campo de la genómica funcional.

La presente invención también es útil para establecer un ensayo de screening de drogas, en una forma de alguna manera análoga a los ensayos descritos en las Patentes de EE.UU. Nos. 4,980,281 y 5,688,655. Por ejemplo, si se desean inhibidores del proceso angiogénico (por ejemplo, en la investigación contra el cáncer), la presente invención se podría utilizar para distribuir uno o más factores angiogénicos a un mamífero, el(los) factor(es) angiogénico(s) se podría expresar para estimular el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos y varias moléculas candidatas a nuevos fármacos se podrían administrar al mamífero, con el propósito de investigar si tales moléculas candidatas a nuevos fármacos inhiben el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos estimulado por el factor angiogénico distribuido por AAVr.

La expresión de la secuencia heteróloga de ácido nucleico está bajo el control de una secuencia promotor/regulador. Mediante "secuencia promotor/regulador" se quiere decir una secuencia de ADN que se requiere para la expresión. En algunos casos, la secuencia promotor/regulador puede ser una secuencia promotor nuclear y en otros casos, la secuencia promotor/regulador también puede incluir una secuencia potenciadora y/o otras secuencias reguladoras que aumentan la expresión de la secuencia heteróloga de ácido nucleico. El promotor puede ser uno que es constitutivo o puede ser inducible. Si se quiere expresión constante de la secuencia heteróloga de ácido nucleico, entonces se usa un promotor constitutivo. Ejemplos de promotores constitutivos bien conocidos incluyen el promotor temprano inmediato del citomegalovirus (CMV), promotor del virus del sarcoma de Rous, y similares. Numerosos otros ejemplos de promotores constitutivos son bien conocidos en la técnica y se pueden emplear en la práctica de la invención.

Si desea la expresión controlada de la secuencia heteróloga de ácido nucleico, entonces se debe utilizar un promotor inducible. En un estado no inducido, el promotor inducible está "silencioso". Mediante "silencioso" se quiere decir que en ausencia de un inductor se detecta poca o ninguna expresión de la secuencia heteróloga de ácido nucleico; en presencia de un inductor, sin embargo, se produce la expresión de la secuencia heteróloga de ácido nucleico. Con frecuencia, se puede controlar el nivel de expresión variando la concentración del inductor. Controlando la expresión, por ejemplo variando la concentración del inductor de modo que un promotor inducible se estimula de forma más fuerte o más débil, se puede afectar la concentración del producto transcrito de la secuencia heteróloga de ácido nucleico. En el caso en el que la secuencia heteróloga de ácido nucleico codifica un gen, se puede controlar la cantidad de proteína que se sintetiza. De esta manera, es posible variar la concentración del producto terapéutico. Ejemplos de promotores inducibles bien conocidos son: un promotor de estrógeno o andrógeno, un promotor de metalotioneína, o un promotor que responde a ecdisona. Otros ejemplos numerosos son bien conocidos en la técnica y se pueden utilizar en la práctica de la invención.

Además de los promotores constitutivos e inducibles (que suelen funcionar en una gran variedad de tipos de células o tejidos), se pueden utilizar promotores específicos de tejido para alcanzar expresión de la secuencia heteróloga de ácido nucleico específica en células o tejidos. Ejemplos bien conocidos de promotores específicos de tejido incluyen varios promotores específicos de músculo incluyendo: el promotor de la α -actina esquelética, el promotor de la actina cardiaca, promotor de la troponina C esquelética, promotor de la troponina C cardiaca de de contracción lenta, y el promotor/potenciador de la creatina quinasa. Existen numerosos promotores específicos de músculo que son bien conocidos en la técnica y que se pueden emplear en la práctica de la invención (para una revisión en promotores específicos de músculo ver Miller *et al.*, (1993) *Bioessays* 15: 191-196).

Una vez distribuida, la secuencia heteróloga de ácido nucleico, contenida en el virión AAVr, se expresa para producir un efecto terapéutico. Mediante "efecto terapéutico" se quiere decir un nivel de expresión de una o más secuencias heterólogas de ácido nucleico suficiente para alterar un componente de una enfermedad (o trastorno) hacia el desenlace o conclusión deseados, tal que la enfermedad o trastorno del paciente muestra mejora, con frecuencia reflejada en la mejoría de un indicio o síntoma relacionado con la enfermedad o trastorno.

El uso inventivo es también para el tratamiento de de isquemia en seres humanos. Los métodos incluyen la distribución de los viriones AAVr que contienen una secuencia heteróloga de ácido nucleico (es decir, un gen heterólogo) que codifica un factor angiogénico, la expresión del cual produce un efecto terapéutico. Los viriones AAVr se introducen en un mamífero mediante inyección intramuscular directa en un músculo. En una forma de realización preferida, al paciente de isquemia se le inyectan al menos una vez en tejido muscular los viriones AAVr que contienen una secuencia heteróloga de ácido nucleico que codifica para uno de los factores angiogénicos. En un aspecto, el efecto terapéutico obtenido es un aumento en la formación de vasos sanguíneos. En otro aspecto, se consigue un aumento en

el flujo sanguíneo al tejido isquémico. El experto en la materia valorará que se pueden medir otros parámetros clínicos para determinar si se ha conseguido un efecto terapéutico.

La dosis de virión AAVr que se requiere para conseguir un efecto terapéutico particular, por ejemplo, el número total de viriones AAVr que se introducen en el sujeto mamífero, variará basado en varios factores incluyendo, pero no estando limitado a: la especie de mamífero, la vía de administración del virión AAVr, el nivel de expresión de la secuencia heteróloga de ácido nucleico requerido para conseguir el efecto terapéutico, la enfermedad o trastorno específicos que se están tratando (por ejemplo, isquemia periférica o de miocardio), respuesta inmune del huésped al virión AAVr, respuesta inmune del huésped al producto de expresión de la secuencia heteróloga de ácido nucleico, y estabilidad del producto de expresión. El experto en la materia puede determinar fácilmente un intervalo de dosis del virión AAVr para tratar a un paciente con una enfermedad o trastorno particular basados en los factores mencionados anteriormente, así como en otros factores. Respecto al tratamiento de un paciente de isquemia, se proporciona una dosis que es al menos de 10^{10} viriones AAVr, preferiblemente entre alrededor de 10^{10} - 10^{15} , más preferiblemente entre alrededor de 10^{11} - 10^{14} , y lo más preferiblemente entre alrededor de 10^{12} - 10^{13} viriones AAVr para conseguir un efecto terapéutico deseado.

La invención proporciona métodos para la transducción con éxito de viriones AAVr que producen la expresión terapéutica de secuencias heterólogas de ácido nucleico. Con el fin de clarificar y ejemplificar la mejor manera de la presente invención, la discusión que sigue ejemplifica la distribución de VEGF mediante viriones AAVr a un mamífero.

Posteriormente hay ejemplos de formas de realización específicas para llevar a cabo la presente invención. Los ejemplos se ofrecen solo con propósitos ilustrativos, y no pretenden limitar el ámbito de la presente invención en modo alguno.

Ejemplo 1

Construcción, producción y purificación de un vector recombinante AAV-hVEGF₁₆₅

El virus recombinante adenoasociado con el factor de crecimiento endotelial vascular₁₆₅ humano (AAVr-hVEGF₁₆₅) se construyó utilizando técnicas estándar de biología molecular que son bien conocidas en la técnica. Brevemente, se cortó el gen de la beta-galactosidasa (LacZ) del vector AAVr-LacZ (AAVr-LacZ se describe en la Patente de EE.UU. No. 5,858,351) y se reemplazó con el ADNc de longitud completa del VEGF₁₆₅ humano bajo el control del promotor CMV y flanqueado, en su extremo 3', por la secuencia de poliadenilación del SV40. Los viriones recombinantes AAV-hVEGF₁₆₅ se produjeron después utilizando el método de la triple transfección descrito en las Patentes de EE.UU. Nos. 6,001,650 y 6,004,797, *supra* y se purificaron utilizando técnicas también descritas en las Patentes de EE.UU. Nos. 6,001,650 y 6,004,797, *supra*.

Ejemplo 2

*Ensayos *in vitro* de AAV-hVEGF₁₆₅ en miocitos cardiacos de rata*

Los miocitos cardiacos se prepararon de ventrículos de ratas Sprague-Dawley de 1 día de edad. Tras la disociación en tripsina al 0.25%, las suspensiones de células se lavaron con DMEM (GIBCO BRL, Grand Island, NY) suplementado con SFT al 10% (Cell Culture Laboratories, Cleveland, OH) y se centrifugaron a 500 g durante 10 min. El precipitado de células se resuspendió entonces en DMEM con SFT al 10%. Para el enriquecimiento selectivo de los miocitos cardiacos, las células disociadas se pre-sembraron durante 1 hora, durante la cual los no miocitos se adherieron en seguida al fondo de la placa de cultivo. Las suspensiones resultantes de miocitos se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad de 4×10^5 células/pocillo. Setenta y dos horas después de la siembra, los miocitos cardiacos de rata cultivados se transdujeron con viriones AAVr-hVEGF₁₆₅ (5×10^3 viriones/célula) durante 24 horas. Para detectar VEGF en el citosol de los miocitos cardiacos de rata transducidos, se llevó a cabo una inmunotransferencia. Los miocitos cardiacos de rata transducidos se lavaron con PBS helado y se resuspendieron en tampón de lisis (Nonidet P-40 al 1%, Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, NaCl 150 mM, aprotinina 200 U/ml, PMSF 1 mM). Después de incubar en hielo durante 30 min, los extractos de células se centrifugaron para retirar los restos celulares. Los lisados de células (15 µg de proteína) se separaron entonces mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 7.5% y se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilideno. Las membranas se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente en TBS con Tween 20 (TBST: Tris-HCl 20 mM, pH 7.4, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0.05%) y leche desnatada al 4%. Las membranas se incubaron entonces con el anticuerpo anti-VEGF₁₆₅ humano (Sigma, St. Louis, MO) a una dilución de 1:1000 durante la noche a 4°C en TBST. La unión específica del anticuerpo se detectó mediante el sistema de detección ECL (Amersham, Buckinghamshire, RU) según las instrucciones del fabricante. En miocitos cardiacos de rata transducidos con AAVr-hVEGF₁₆₅, VEGF se detectó mediante inmunotransferencia. Como control negativo se utilizó AAV-LacZ recombinante; en miocitos cardiacos de rata transducidos con AAVr-LacZ, no se detectó VEGF (la construcción del vector AAVr-LacZ se describe completamente en la Patente de EE.UU. No. 5,858,351, *supra*). La Fig. 1 muestra los resultados de la inmunotransferencia.

Para medir la presencia de VEGF en tejido de miocitos cardiacos de rata, se realizó una tinción inmunohistoquímica. Los miocitos cardiacos de rata transducidos se lavaron dos veces con TBS y se bloquearon con suero normal de conejo, diluido 1:5 en TBS, durante 45 min. Las células se incubaron después durante la noche con anticuerpo anti-VEGF₁₆₅ humano (2 µg/ml) seguido de incubación durante 1 h con IgG de conejo anti-ratón conjugadas con peroxidasa.

sa (dilución 1:50, preabsorbida durante la noche a 4°C con suero preinmune de rata al 10% y al seroalbúmina bovina al 3%). La unión del anticuerpo se detectó con tetrahidrocloruro de 3,3-diaminobencidina (DAB, Sigma) en tampón Tris 10 mM, pH 7.2, con H₂O₂ al 0.01%. Los experimentos de control negativo consistieron en la omisión del vector en el medio de incubación. La Fig. 2 muestra los resultados. Aproximadamente el 60% de los miocitos cardiacos de rata transducidos con AAVr-hVEGF₁₆₅ se tiñeron positivamente para VEGF (Fig. 2A), mientras que los miocitos cardiacos de rata transducidos con AAVr-LacZ no muestran tinción para VEGF (Fig. 2B).

Para medir la secreción de VEGF al medio de cultivo de los miocitos de rata transducidos, se llevó a cabo un ensayoinmunoanálisis (ELISA) según las instrucciones del fabricante incluidas en el kit de ELISA (Amersham). Después de que los miocitos se incubaron con AAVr-hVEGF₁₆₅ durante 24 h, los miocitos se lavaron dos veces con PBS y se incubaron en un medio sin SFT. Veinticuatro horas tras reemplazar el medio de cultivo, se midió la concentración de VEGF en el medio. La Fig. 3 muestra los resultados. La concentración de VEGF en el medio de cultivo aumentó de una forma dependiente de la dosis del vector. La concentración máxima de VEGF secretado se produjo a una dosis del vector de 5×10^3 y su medida fue de 6 ng/ml. El medio de cultivo de miocitos cardiacos de rata no transducidos y miocitos cardiacos de rata transducidos con AAVr-LacZ no contenía niveles detectables de VEGF.

Ejemplo 3

Ensayo in vivo de AAV-hVEGF₁₆₅ en corazón isquémico de ratón

Para producir un miocardio isquémico, se expone la tráquea de un ratón adulto a través de una incisión en la línea media del cuello, después se coloca un tubo en la tráquea utilizando un angiocatéter de tamaño apropiado (tal como uno disponible de Becton Dickson), y se conecta entonces el tubo a un ventilador (como el ventilador de volumen controlado para animales pequeños disponible de Harvard Rodent Ventilador, modelo 683, Harvard Apparatus, South Natick, MA). Tras establecer el control de la respiración mediante el ventilador, se hace una incisión toracotómica en el segundo espacio intercostal, y se coloca en la incisión un pequeño retractor para exponer el corazón. Después se liga la arteria coronaria descendente anterior con una sutura quirúrgica. Aproximadamente de 10^{10} a 10^{15} viriones AAVr-hVEGF₁₆₅ contenidos en 50 μ l de PBS se inyectan directamente en varios lugares del miocardio en la pared ventricular izquierda alrededor de la región isquémica. Después de inocular los viriones AAVr, se coloca en el lugar de la incisión un tubo pequeño conectado a una jeringuilla para evacuar el aire de la cavidad torácica, reestableciendo la presión negativa antes de cerrar la incisión. El tubo de la tráquea se retira suavemente después reestablecer la respiración voluntaria y se cierra la incisión en el cuello. Los viriones recombinantes AAV-hVEGF₁₆₅ se inyectan en miocardio en varios lugares alrededor de la región isquémica. Los corazones se recogen dos meses después de la inoculación con AAVr-hVEGF₁₆₅, y se comparan con un grupo control de ratones (es decir, ratones que no se han hecho isquémicos quirúrgicamente) que también reciben la misma dosis de viriones AAVr-hVEGF₁₆₅ distribuidos de la misma manera. Al menos se recogen dos corazones por grupo de animales experimentales. Se cuenta el número de vasos sanguíneos pequeños con un microscopio utilizando un objetivo 20x.

Ejemplo 4

Administración de vectores AAV-LacZ a músculo esquelético de rata

Se anestesiaron ratas Sprague-Dawley machos (200-250 g) con éter dietílico. Se realizó una incisión en la piel de aproximadamente 5 mm de longitud sobre el músculo tibial anterior y se identificó la fascia. Los vectores recombinantes AAV se diluyeron en solución salina tamponada con Hepes 50 mM y se añadió negro de carbón (Pelikan Ink, Gunther Wagner) para permitir localizar el sitio de la inyección. Se inyectaron 200 μ l de una suspensión de viriones AAVr conteniendo AAV-LacZ (10^{13} viriones/200 μ l) con una aguja de 29 gauge directamente en el músculo tibial anterior. La tinción histoquímica con X-Gal reveló expresión de la β -galactosidasa en la mayoría de las fibras musculares del área de inyección y este patrón se mantuvo consistente durante la duración del período de estudio, que fue de 12 semanas.

Ejemplo 5

Administración de AAV-hVEGF₁₆₅ a extremidades posteriores isquémicas y contralaterales de rata

Se anestesiaron ratas Sprague-Dawley machos con una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (50 mg/kg). Se hizo una incisión longitudinal en el muslo derecho, tras la cual se cortó quirúrgicamente la arteria femoral para inducir isquemia en la extremidad. Las ratas se trataron después con AAVr-hVEGF₁₆₅ (2×10^{13} viriones; n=8) mediante inyección intramuscular en sitios de la extremidad posterior isquémica y también en sitios de la extremidad contralateral. La suspensión de vector (100 μ l/sitio) se inyectó en cuatro sitios diferentes en los músculos principales del muslo (cuadriceps y aductor). Tres ratas se sometieron a operaciones quirúrgicas fingidas para una valoración preliminar del examen hemodinámico. Para confirmar la expresión de VEGF y evaluar la posibilidad de que VEGF se expresara en tejidos lejanos, se realizó una transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). La expresión del gen a nivel del ARNm se evaluó mediante RT-PCR. El ARN celular total de tejido muscular y tejidos lejanos (por ejemplo, cerebro, corazón, hígado, bazo, riñón, testículos) se aisló utilizando RNA STAT-60 (TET-TEST, Inc., Friendswood, Tex.). El ARN extraído se trató con DNasa I (Takara Shuzo Co. Tokio, Japón) para eliminar la contaminación de ADN. La síntesis de la primera cadena de ADNc se llevó a cabo en condiciones recomendadas en el kit ProStar First Strand RT-PCR (Stratagene, La Jolla, Calif.). Las amplificaciones de PCR se llevaron

ES 2 288 993 T3

a cabo utilizando cebadores específicos para el VEGF humano (directo: 5'-GAGGGCAGAATCATCACGAAGT-3'; inverso: 5'-CCACCTTCTTGATGTCATCA-3'). El ARNm de GAPDH se utilizó como estándar interno. Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 2.0% teñidos con bromuro de etidio. La expresión génica de VEGF se observó 4 y 10 semanas después de la inyección (la Fig. 4 muestra los resultados). Por otra parte, no se detectó expresión génica de VEGF en músculos transducidos con AAV-LacZ. No se detectó expresión génica de VEGF en cerebro, corazón, hígado, bazo, riñón, y testículos en ratas tratadas con AAVr-hVEGF₁₆₅ después de 4 semanas de la inyección (Fig.4).

Ejemplo 6

Secreción de VEGF de músculo esquelético de ratas transducidas

Se examinó la secreción de VEGF de músculo transducidos de extremidades traseras isquémicas y contralaterales. Los tejidos musculares tibiales anteriores inyectados con AAV-hVEGF₁₆₅ recombinante se cortaron y se cultivaron en medio DMEM/F-12 sin suero. Se utilizó el kit de ELISA para determinar las concentraciones de VEGF en el sobrenadante del cultivo de músculo. Diez semanas después de la inyección de AAVr-hVEGF₁₆₅, se detectó VEGF, hasta una concentración de 5.3 ± 1.5 ng/g de tejido/24 h, en el sobrenadante del cultivo de tejido muscular inyectado con AAVr-hVEGF₁₆₅ (1.8×10^{13} viriones/sitio) (Fig. 5). Las medidas mediante ELISA no revelaron ningún VEGF en sangre tomada de las venas periféricas de las ratas 1, 2, 4 y 8 semanas tras la inyección con AAVr-hVEGF₁₆₅.

Ejemplo 7

Medida del flujo sanguíneo y termografía

Seis semanas después de la transferencia genética de AAVr-hVEGF₁₆₅, cada rata se reanestesió con una inyección intraperitoneal y se afeitaron las zonas inferiores del cuerpo. La temperatura de la piel de la extremidad posterior de la rata se midió mediante termografía infrarroja (TH3106ME, NEC San-ei Instruments, Ltd., Tokio, Japón). El flujo sanguíneo en la arteria tibial posterior se midió mediante un medidor de flujo ultrasónico de tiempo (T206, Transonic Systems, Inc., Ithaca, New York) utilizando un transductor de flujo perivascular (en la Fig. 6A se muestra un gráfico representativo). La arteria tibial posterior se seccionó para dejarla libre y se colocaron los transductores de flujo perivasculares según las instrucciones del fabricante. Se registró simultáneamente el flujo sanguíneo de las extremidades isquémicas y contralaterales, y se expresó como un % respecto a las extremidades contralaterales. Seis semanas después de la inyección con AAV-LacZ y AAVr-hVEGF₁₆₅, se midió el flujo sanguíneo. Como se muestra en la Fig. 6B, el flujo medio en las extremidades posteriores isquémicas transducidas con AAVr-hVEGF₁₆₅ ($78.2 \pm 11.3\%$) fue significativamente superior que en las extremidades isquémicas transducidas con AAV-LacZ ($41.5 \pm 5.4\%$). Las medidas utilizando termografía infrarroja mostraron aumentos funcionales similares (en la Fig.7A se muestran imágenes termográficas representativas). La temperatura de la piel de la extremidad isquémica transducida con AAV-LacZ fue aproximadamente 2°C más baja que la de la extremidad contralateral. La temperatura de la piel de la extremidad isquémica transducida con AAVr-hVEGF₁₆₅, sin embargo, se restableció a una temperatura normal (Fig. 7B).

Ejemplo 8

Evaluación histológica

Seis semanas después de la inyección con AAV-LacZ y AAVr-hVEGF₁₆₅, se obtuvieron tejidos musculares isquémicos como secciones transversales de los músculos cuádriceps y aductor de la extremidad posterior isquémica de la rata después del examen hemodinámico. Las secciones congeladas se tiñeron con fosfatasa alcalina utilizando un método de indoxil-tetrazolio para detectar las células endoteliales capilares (la Fig. 8A es una imagen representativa de tejido muscular de rata utilizando este método). La densidad de capilares se evaluó mediante examen histológico de 5 campos seleccionados al azar de una sección de músculo, y se contó el número de capilares (número medio de capilares por mm²). Como se muestra en la Fig. 8B, la densidad de capilares fue significativamente más alta en músculo inyectado con AAVr-hVEGF₁₆₅ ($1062 \pm 75/\text{mm}^2$) que en tejido muscular inyectado con AAV-LacZ ($532 \pm 24/\text{mm}^2$). No se observaron estructuras similares a angioma o infiltraciones de células inflamatorias en las extremidades isquémicas o contralaterales.

ES 2 288 993 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de viriones recombinantes de virus adenoasociados (AAVr) libres de viriones AAV salvajes y de virus ayudantes, que comprenden un gen que codifica un factor angiogénico en la producción de un medicamento para el tratamiento de trastornos isquémicos, en donde los viriones AAVr se introducen mediante inyección directa en un músculo.
- 10 2. El uso de la reivindicación 1, en donde el factor angiogénico se selecciona del grupo que consiste en factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), angiopoyetina-1, y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).
- 15 3. El uso de la reivindicación 2, en donde el factor angiogénico es un factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).
- 20 4. El uso de la reivindicación 3, en donde dicho VEGF es VEGF165.
- 25 5. El uso de las reivindicaciones 1 a 4, en donde se distribuyen alrededor de 10^{10} hasta alrededor de 10^{15} viriones AAVr.
- 30 6. El uso de las reivindicaciones 1 a 5, en donde se distribuyen al menos dos genes de factores angiogénicos.
- 35 7. El uso de la reivindicación 6, en donde se distribuyen un gen que codifica VEGF y un gen que codifica angiopoyetina-1 mediante dichos viriones AAVr.
- 40 8. El uso de la reivindicación 6, en donde se distribuyen un gen que codifica FGF y un gen que codifica VEGF mediante dichos viriones AAVr.
- 45 9. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde dicho músculo es un músculo cardíaco.
- 50 10. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde dicho músculo es un músculo esquelético.
- 55 11. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde dicho músculo es un músculo liso.
- 60 12. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde dicho tratamiento implica la formación de nuevos vasos sanguíneos.
- 65 13. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde dicho tratamiento implica un aumento en el flujo sanguíneo.

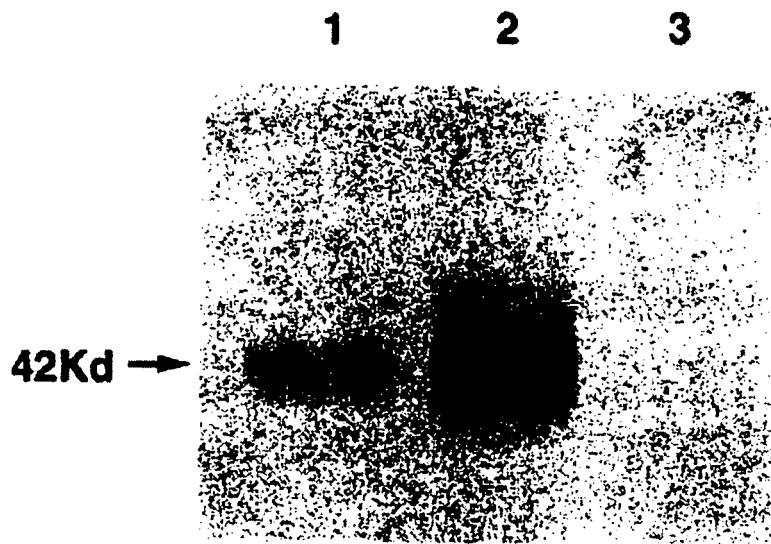


FIG. 1

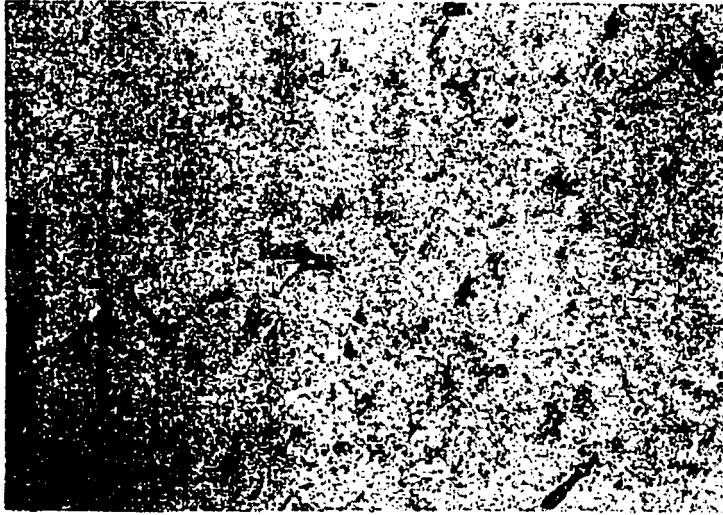


FIG. 2A



FIG. 2B

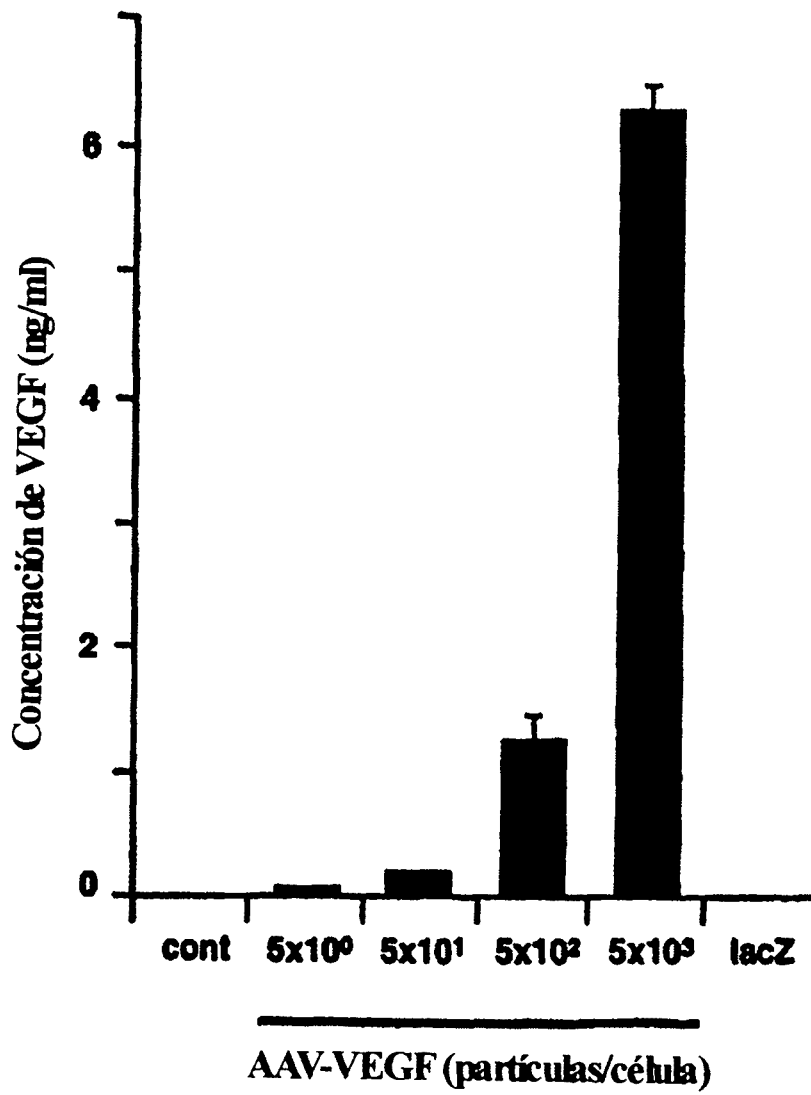


FIG. 3

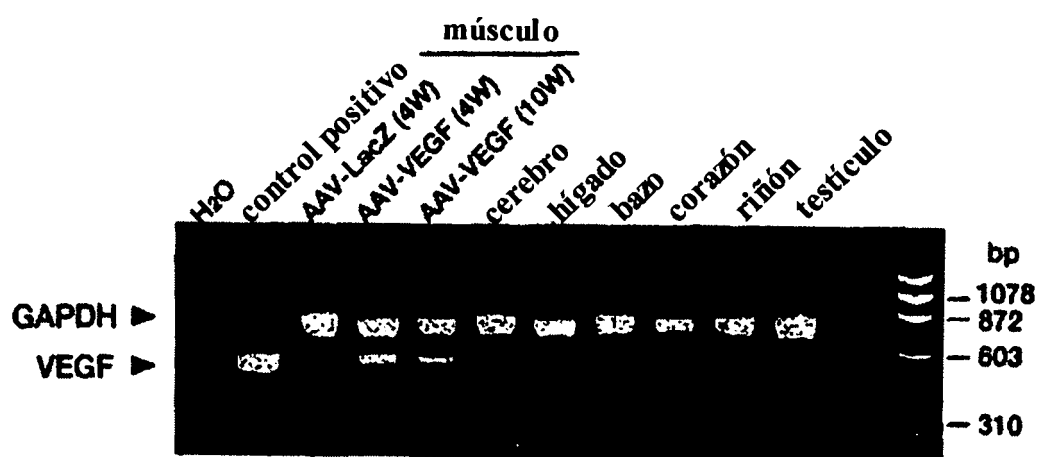


FIG. 4

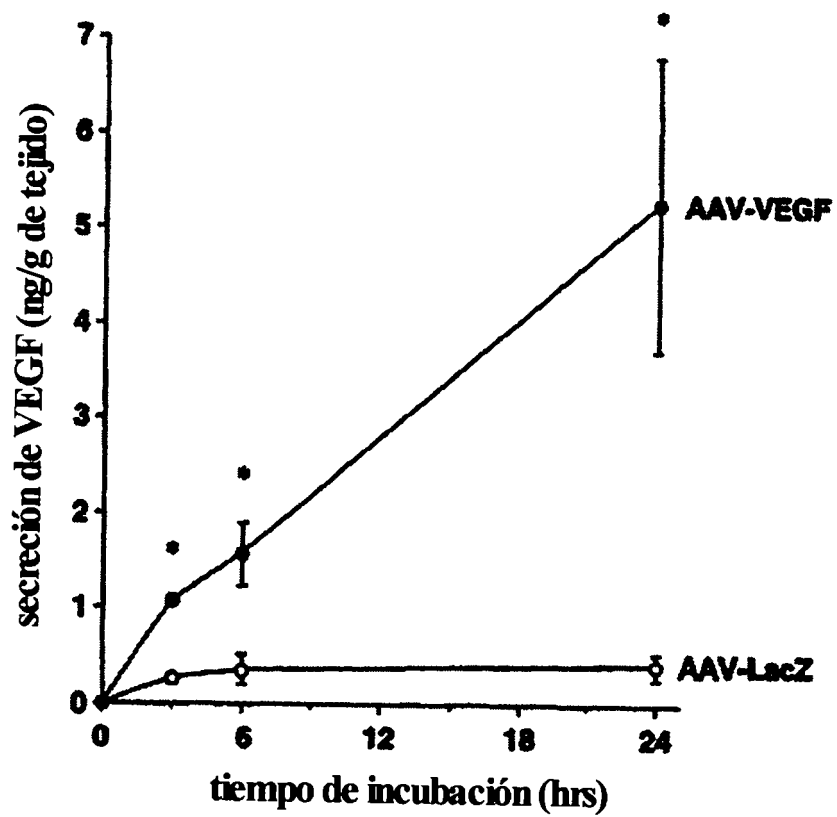


FIG. 5

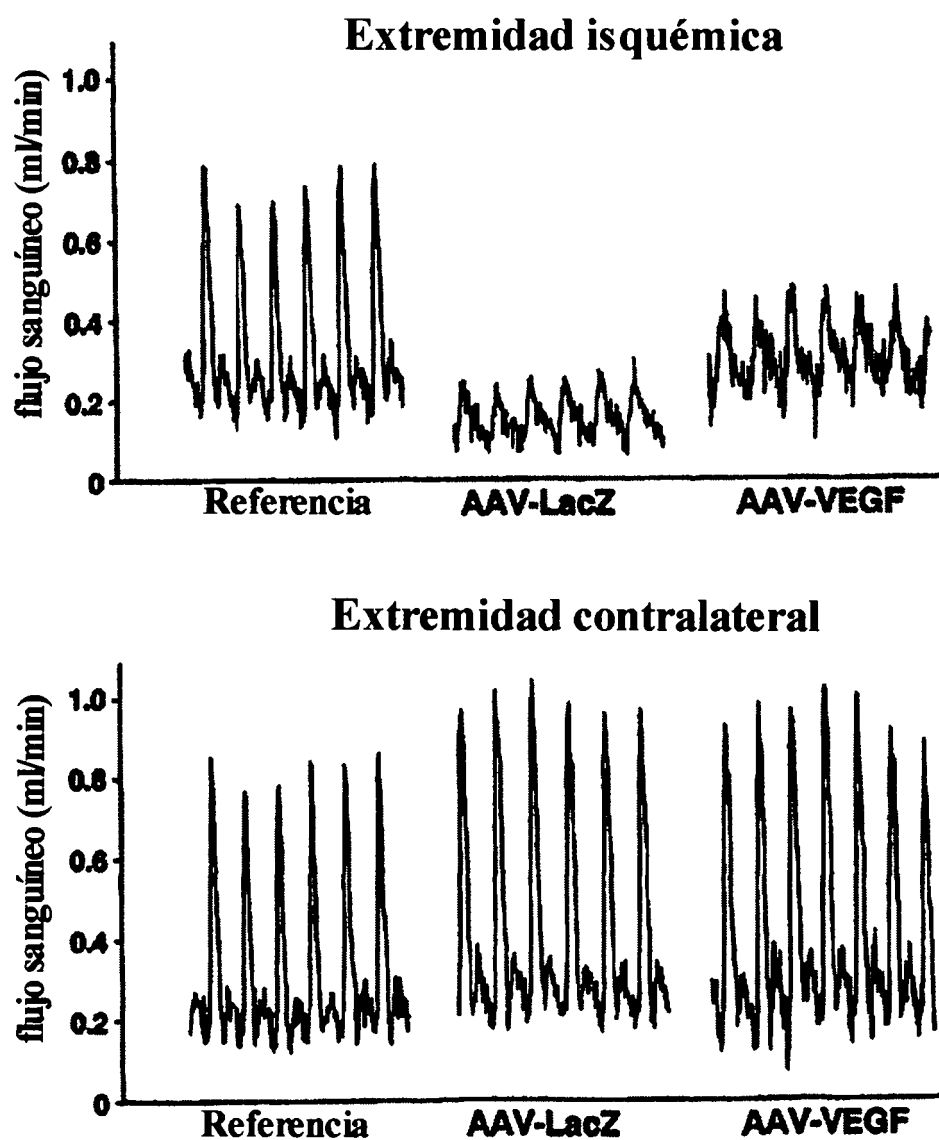


FIG. 6A

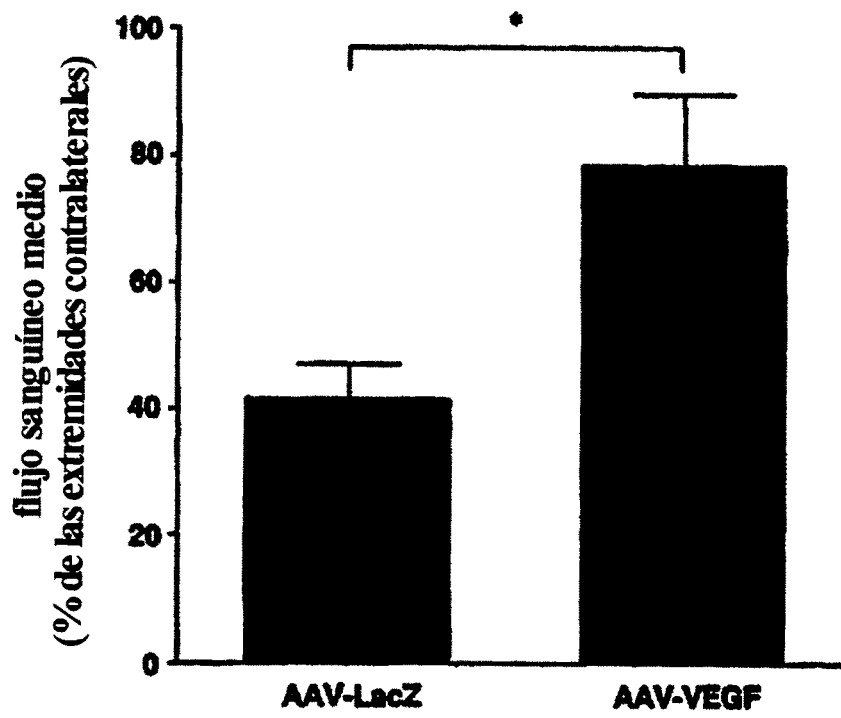


FIG. 6B

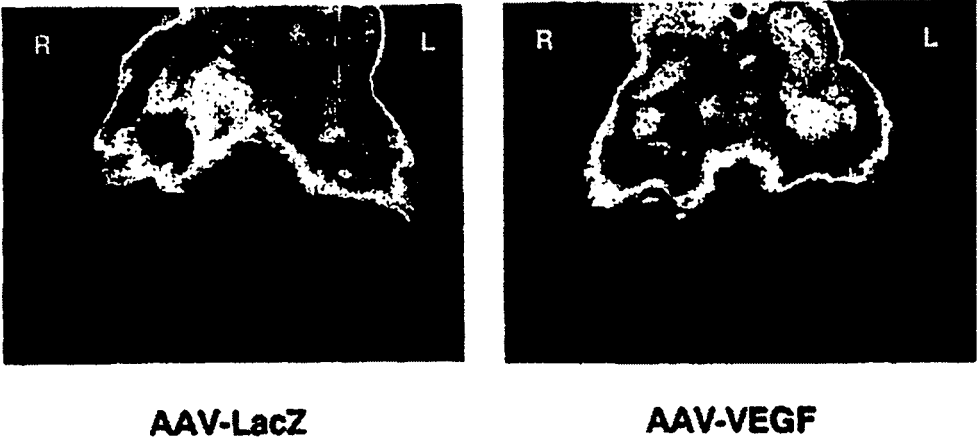


FIG. 7A

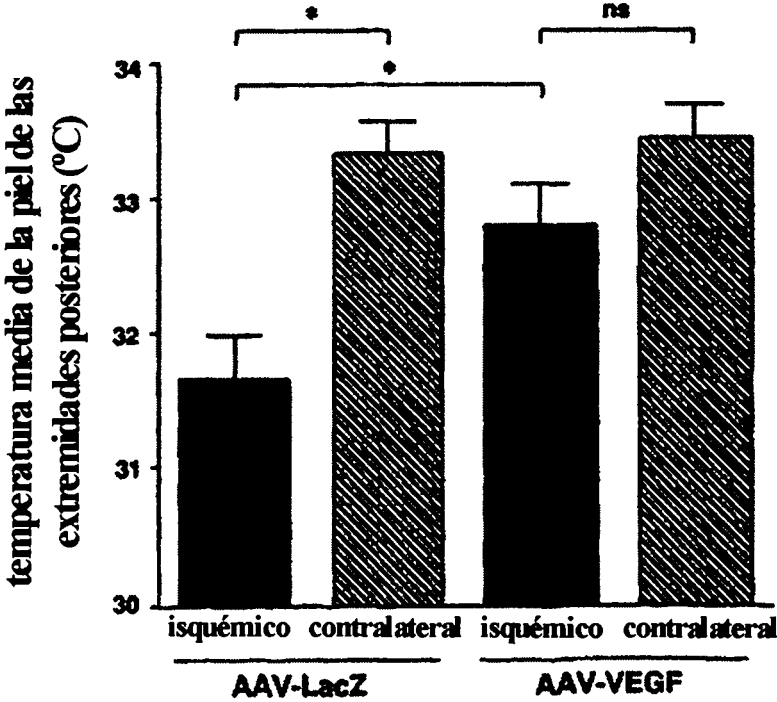


FIG. 7B

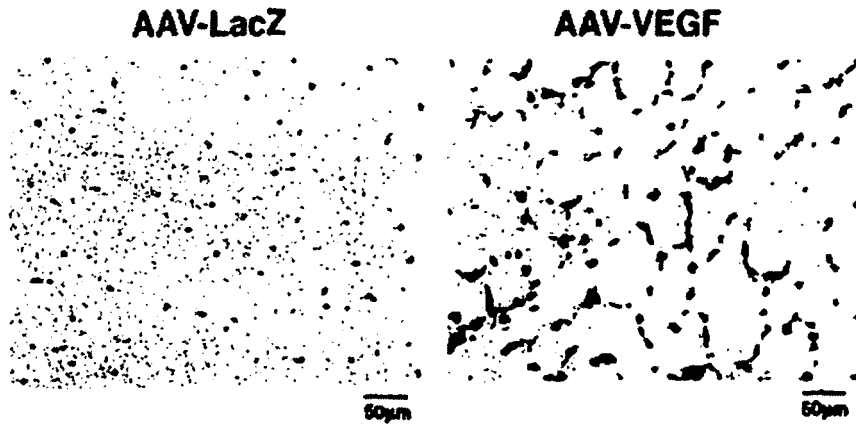


FIG. 8A

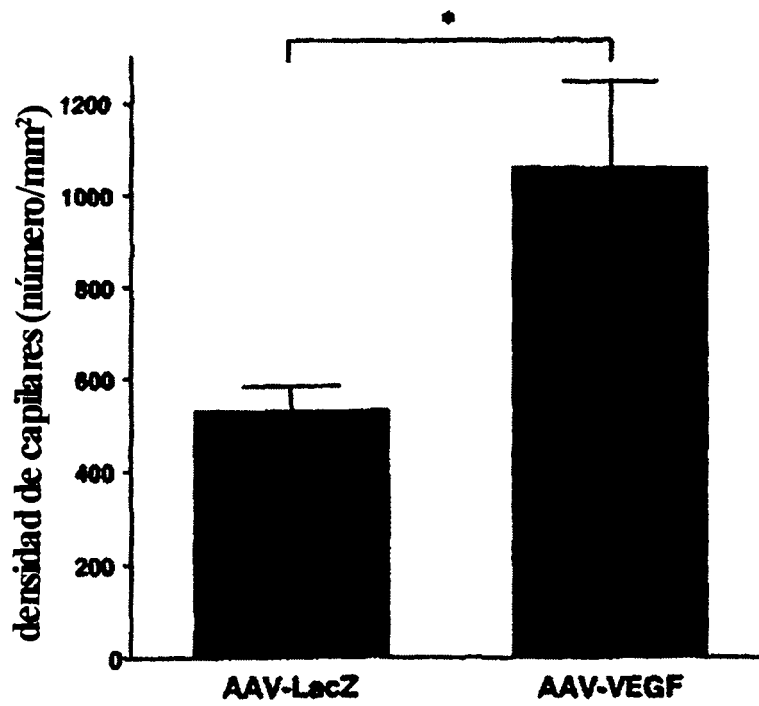


FIG. 8B

ES 2 288 993 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> OZAWA, Keiya
 SHIMPO, Masahisa
 5 IKEDA, Uichi
 MAEDA, Yoshikazu
 SHIMADA, Kazuyuki

 <120> DISTRIBUCIÓN DE FACTORES ANGIOGÉNICOS MEDIADA POR VIRUS ADENOASOCIADOS
 10 <130> 0800-0026.40
 <140>
 <141>
 <150> 60/226,056
 15 <151> 17-08-2000
 <160> 2
 <170> PatentIn Ver. 2.0
 20 <210> 1
 <211> 576
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: VEGF-165
 <220> CDS
 30 <222> (1)...(576)

 <400> 1

35	atg aac ttt ctg ctg tct tgg gtg cat tgg agc ctt gcc ttg ctg ctc	48
	Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu Leu	
	1 5 10 15	
40	tac ctc cac cat gcc aag tgg tcc cag gct gca ccc atg gca gaa gga	96
	Tyr Leu His His Ala Lys Trp Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala Glu Gly	
	20 25 30	
45	gga ggg cag aat cat cac gaa gtg gtg aag ttc atg gat gtc tat cag	144
	Gly Gly Gln Asn His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln	
	35 40 45	
50	cgc agc tac tgc cat cca atc gag acc ctg gtg gac atc ttc cag gag	192
	Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu	
	50 55 60	

55

60

65

ES 2 288 993 T3

Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His
100 105 110

5 Gln Gly Gln His Ile Gly Glu Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys
115 120 125

10 Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp Arg Ala Arg Gln Glu Asn Pro Cys Gly
130 135 140

15 Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr
145 150 155 160

20 Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln
165 170 175

25 Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg
180 185 190

30

35

40

45

50

55

60

65