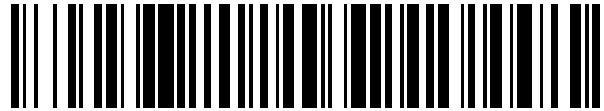


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 819 973**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/62** (2006.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.09.2016 PCT/GB2016/053057**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.04.2017 WO17055872**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.09.2016 E 16777780 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.07.2020 EP 3356395**

54 Título: **Terapia génica para la diabetes**

30 Prioridad:

**30.09.2015 GB 201517329**

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

**19.04.2021**

73 Titular/es:

**UCL BUSINESS LTD (100.0%)  
The Network Building, 97 Tottenham Court Road  
London W1T 4TP, GB**

72 Inventor/es:

**NATHWANI, AMIT y  
NOTARIDOU, MARIA**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**ES 2 819 973 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

Terapia génica para la diabetes

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a un nuevo enfoque de terapia génica para tratar la diabetes. En particular, este enfoque implica el uso de un nuevo gen de insulina humana con codones optimizados. Por lo tanto, la invención se refiere a esta nueva secuencia génica, vectores que comprenden la secuencia génica y métodos que implican el uso de la secuencia.

10

**Antecedentes de la invención**

La diabetes es un trastorno metabólico de por vida que afecta a 3,2 millones de personas en el Reino Unido y a más de 347 millones de personas en todo el mundo. Es una de las principales causas de muerte con 1,5 millones de muertes al año. Más del 80 % de las muertes por diabetes se producen en países de ingresos bajos y medianos. El NHS gasta aproximadamente 10 mil millones de libras anualmente en diabetes, que es casi el 10 por ciento del presupuesto total del NHS.

15

La diabetes es una enfermedad crónica concurrente con complicaciones secundarias graves, provocada principalmente por un mal control de la glucemia. El tratamiento real con insulina exógena con frecuencia no logra prevenir ni controlar estas complicaciones, lo que conduce a morbilidad y mortalidad significativas.

20

La diabetes mellitus se clasifica habitualmente como diabetes de tipo 1 o tipo 2. El primero resulta de la insuficiencia y/o destrucción de las células  $\beta$  productoras de insulina en el páncreas, con frecuencia debido a una respuesta autoinmunitaria. Por el contrario, el tipo 2 se caracteriza por resistencia a la insulina, habitualmente combinada con un defecto de secreción de la insulina. Ambas formas de diabetes se caracterizan por hiperglucemia que, si no se controla adecuadamente, puede conducir a complicaciones graves a largo plazo, incluyendo enfermedad cardiovascular, ictus, insuficiencia renal, úlceras en los pies y daños en los ojos. El tratamiento actual de la diabetes tiene como objetivo reducir los niveles de glucosa en sangre con insulina, el tratamiento principal para la diabetes de tipo I, y una combinación de biguanidas y sulfonilureas con o sin el uso de insulina para la diabetes de tipo II. Este tratamiento es muy exigente, invasivo, caro y no curativo. Además, relativamente pocos pacientes alcanzan realmente un estado normoglucémico, aunque esto está cambiando con el uso de bombas de infusión de insulina, reguladas por dispositivos sensores de glucosa, donde estén disponibles y sean asequibles.

25

30

La terapia génica ofrece el potencial de una cura a través de la producción endógena continua de insulina después de una única maniobra terapéutica. La diabetes de tipo I se adapta bien a enfoques de transferencia de genes somáticos, ya que surge de un defecto en una sola proteína, insulina. Además, se ha demostrado la expresión ectópica de insulina humana funcional en diversas situaciones diferentes.

35

Ha habido muchos intentos de terapia experimental génica y con células madre para tratar la diabetes. Sin embargo, la mayoría implican protocolos complicados y manipulaciones celulares *ex vivo*, seguido del trasplante de células transfectadas o transdiferenciadas a los animales diabéticos. La terapia génica directa *in vivo* es teóricamente atractiva al eliminar etapas *in vitro* con los riesgos asociados de infección e incapacidad de los trasplantes de células transfectadas con genes de sobrevivir y desarrollar un aporte sanguíneo adecuado.

40

45

El hígado, con sus orígenes embriológicos en endodermo primitivo similar al páncreas y la importante función que desempeña en la homeostasis de la glucosa, se ha considerado un sitio adecuado para sintetizar insulina. Entre los vectores disponibles para la terapia génica, ha habido un interés considerable en los vectores víricos adenoasociados (AAV) en parte debido a su excelente perfil de seguridad. Estos vectores, cuando se pseudotipifican con la cápside de serotipo 8 (AAV8), han mostrado un tropismo notable para el hígado. A diferencia de otros vectores víricos, p. ej., adenovirus y poxvirus, la prevalencia de anticuerpos neutralizantes contra AAV8 en seres humanos es baja, lo que permite la transducción eficaz del hígado después de una inyección sistémica sencilla de AAV8, como se ilustra en pacientes con hemofilia B grave (Nathwani, *et al* 2011). En 2011, Nathwani y colaboradores informaron de que una sola inyección de factor IX de AAV8 en el tratamiento clínico de pacientes con hemofilia B tuvo efectos terapéuticos alentadores de larga duración.

50

55

La terapia génica para la diabetes podría facilitarse mediante el desarrollo de un casete de expresión pequeño impulsado por un promotor específico del hígado que impulsa el gen de la proinsulina humana escindible por furina.

60

La insulina se sintetiza como parte de una proteína precursora de 11,5 kDa llamada proinsulina. La proinsulina se empaqueta en vesículas secretoras donde se procesa a insulina madura (6 kDa).

65

El documento WO 2005/097981 desvela un vector vírico del herpes simple que puede contener una secuencia de nucleótidos que codifica la insulina. Sin embargo, esta secuencia de nucleótidos es la secuencia de tipo silvestre y no proporciona niveles de expresión particularmente altos.

Notaridou, M. *et al.*, HUMAN GENE THERAPY, vol. 26, n.º 10, página A67 describe la optimización de codones específica del hígado de la preproinsulina humana en un vector de AAV8 que tiene un aumento de 10 a 20 veces de la expresión de proteínas.

- 5 El documento WO2015/012924 describe tablas de uso codónico para la optimización de la expresión de proteínas en el hígado.

### Sumario de la invención

- 10 Los inventores han descubierto sorprendentemente que una nueva secuencia de insulina con codones optimizados da lugar a un aumento de al menos 10 veces de la producción de insulina en células transducidas con esa secuencia en comparación con el gen de la insulina de tipo silvestre (gen *INS*).

- 15 En una realización particularmente preferida, la secuencia de nucleótidos tiene al menos 89 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO. 1. A este respecto, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína preproinsulina funcional en donde la secuencia de nucleótidos tiene al menos 89 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO. 1.

- 20 En realizaciones adicionales, la secuencia de nucleótidos tiene al menos 90 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO. 1. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos 91 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO. 1. En otras realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos 92 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO. 1. En realizaciones particulares, la secuencia de nucleótidos tiene al menos 93 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO. 1. En realizaciones adicionales, la secuencia de nucleótidos tiene al menos 94 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO. 1. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos 95 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO. 1. En otras realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos 96 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO. 1. En realizaciones particulares, la secuencia de nucleótidos tiene al menos 97 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO. 1. En realizaciones adicionales, la secuencia de nucleótidos tiene al menos 98 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO. 1. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos 99 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO. 1. En otras realizaciones, la secuencia de nucleótidos tiene al menos 99,5 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO. 1. En una realización particular, la secuencia de nucleótidos tiene la secuencia de la SEQ ID NO. 1.

- 35 La secuencia de nucleótidos codifica una proteína preproinsulina funcional. Una proteína preproinsulina funcional es una que se puede procesar en una célula a insulina biológicamente activa. Una proteína preproinsulina funcional se puede procesar a proinsulina y después a insulina biológicamente activa.

- 40 La preproinsulina es un precursor biológicamente inactivo de la insulina biológicamente activa. La preproinsulina contiene un péptido señal de 24 restos que dirige la cadena polipeptídica naciente hacia el retículo endoplásmico rugoso (RER). El péptido señal se escinde cuando el polipéptido se transloca al lumen del RER, formando proinsulina. En el RER, la proinsulina se pliega en la conformación correcta y se forman 3 enlaces disulfuro. Después se transporta al aparato de Golgi donde se empaqueta en vesículas secretoras y donde es procesada por una serie de proteasas tales como furina para formar insulina activa madura. La insulina madura tiene 35 aminoácidos menos; 4 se eliminan por completo y los 31 restantes forman el péptido C. El péptido C se extrae del centro de la secuencia de proinsulina; los otros dos extremos (la cadena A y la cadena B) permanecen conectados por enlaces disulfuro y forman la molécula de insulina activa (véase la figura 1 a continuación).

- 50 El péptido C se usa ampliamente para medir la insulina en la sangre, ya que es más estable que la insulina activa y, por lo tanto, proporciona una mejor representación de las cantidades de insulina liberadas (Callejas *et al.*, 2013, Ren *et al.*, 2007).

- En realizaciones preferidas, la secuencia de nucleótidos codifica la preproinsulina humana. Esta se puede procesar a insulina humana. Más preferentemente, la secuencia de nucleótidos codifica una proteína preproinsulina que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 2.

- 55 En un segundo aspecto de la invención, se proporciona un vector para expresar una proteína preproinsulina.

- 60 El vector comprende la molécula de ácido nucleico descrita anteriormente. Esto significa que el vector contiene una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína preproinsulina funcional de modo que, cuando se exprese esta secuencia, la célula en la que está contenido el vector produce una proteína preproinsulina funcional. Esta se puede procesar después a proinsulina que se puede convertir en insulina activa.

- 65 La secuencia de la SEQ ID NO. 1 es una versión con codones optimizados de la secuencia codificante del gen de la insulina (*INS*). No se han optimizado los codones de esta secuencia de manera normal. En lugar de ello, los codones se han seleccionado basándose en los codones utilizados para las proteínas que se expresan a un alto nivel en el hígado. La razón de esto es que el vector normalmente se expresa en el hígado. Se ha descubierto que este proceso especial de optimización de codones produce una secuencia de nucleótidos que proporciona una expresión

sorprendentemente alta. La secuencia de la SEQ ID NO. 1 tiene 85 % de identidad con la secuencia de tipo silvestre.

La secuencia de nucleótidos que codifica una proteína preproinsulina tiene preferentemente entre 300 y 400 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína preproinsulina funcional tiene una longitud de entre 320 y 350 nucleótidos. En otras realizaciones, la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína preproinsulina funcional tiene una longitud de entre 330 y 340 nucleótidos. En realizaciones particulares, la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína preproinsulina funcional tiene una longitud de aproximadamente 333 nucleótidos.

Preferentemente, el vector comprende además un promotor. El promotor provoca la expresión de la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína preproinsulina funcional. Puede usarse cualquier promotor adecuado, tal como HLP, LP1, HCR-hAAT, ApoE-hAAT y LSP. Estos promotores se describen con más detalle en las siguientes referencias: HLP: McIntosh J. *et al.*, Blood, 25 de abril de 2013, 121 (17): 3335-44; LP1: Nathwani *et al.*, Blood, 1 de abril de 2006, 107 (7): 2653-2661; HCR-hAAT: Miao *et al.*, Mol Ther. 2000; 1: 522-532; ApoE-hAAT: Okuyama *et al.*, Human Gene Therapy, 7, 637-645 (1996); y LSP: Wang *et al.*, Proc Natl Acad Sci US A. 30 de marzo de 1999, 96 (7): 3906-3910. También se describe un promotor preferido en el documento WO 2011/005968. Preferentemente, el promotor es un promotor específico del hígado. En realizaciones particulares, el promotor es un promotor HLP.

El vector puede ser cualquier vector adecuado para expresar la proteína preproinsulina, incluyendo vectores víricos y no víricos. Los vectores víricos incluyen un parvovirus, un adenovirus, un retrovirus, un lentivirus o un virus del herpes simple. El parvovirus puede ser un virus asociado a adenovirus (AAV). El vector es preferentemente un vector vírico adenoasociado recombinante (rAAV) o un vector lentivírico. Más preferentemente, el vector es un vector rAAV.

El vector de la invención, cuando se utiliza en el tratamiento por terapia génica, puede proporcionar expresión endógena continua a largo plazo de insulina humana después de la administración en una única vena periférica del vector que codifica el gen de la insulina humana en pacientes con diabetes, p. ej., diabetes de tipo I. Se ha descubierto que la secuencia de insulina con codones optimizados da lugar a un aumento de al menos 10 veces en la producción de insulina en células transducidas con la secuencia en comparación con la secuencia de tipo silvestre.

Las ventajas de este enfoque de transferencia de genes con la secuencia de insulina con codones optimizados son:

1. Una sola infusión en vena periférica de vector que codifica codop-hINS que da lugar a expresión endógena a largo plazo de insulina humana en pacientes con diabetes de tipo I. La expresión estable a largo plazo de la insulina después de la transferencia génica:

- a. ejercerá un beneficio clínico más pronunciado que el posible con inyecciones regulares de insulina, mejorando de este modo la probabilidad de prevenir el daño orgánico específico y la esperanza de vida;
- b. eliminará la necesidad de inyecciones de insulina regulares de por vida mejorando de este modo la calidad de vida; y
- c. dará lugar a un ahorro potencial para el NHS por una reducción/eliminación de los efectos crónicos del control deficiente de la diabetes que es difícil de lograr en >70 % de los pacientes,

2. Expresión más potente a partir del casete de expresión con codones optimizados que da lugar a un beneficio terapéutico utilizando dosis menores de vector;

3. Los niveles continuos en plasma de insulina después de la transferencia génica aumentan la probabilidad de corregir la patología, especialmente el daño a los nervios periféricos;

4. La expresión de insulina del hígado reducirá el riesgo de desarrollar anticuerpos neutralizantes contra esta proteína.

Un vector según la invención puede ser un vector de suministro de genes. Dicho vector de suministro de genes puede ser un vector de suministro de genes vírico o un vector de suministro de genes no vírico.

Por consiguiente, la presente invención proporciona vectores de suministro de genes basados en parvovirus animales, en particular, dependovirus tales como AAV infeccioso humano o de simio, y los componentes de los mismos (p. ej., un genoma de parvovirus animal) para su uso como vectores para la introducción y/o expresión de una proteína preproinsulina en una célula de mamífero. Por tanto, el término "parvovírico", como se usa en el presente documento, abarca dependovirus tales como cualquier tipo de AAV.

Los virus de la familia Parvoviridae son virus animales de ADN pequeños. La familia Parvoviridae puede dividirse en dos subfamilias: Parvovirinae, que infecta a vertebrados, y Densovirinae, que infecta a insectos. Los miembros de la subfamilia Parvovirinae se denominan en el presente documento parvovirus e incluyen el género Dependovirus. Como puede deducirse del nombre de su género, los miembros de la familia Dependovirus son especiales ya que normalmente necesitan la coinfección con un virus auxiliar, tal como adenovirus o herpesvirus, para realizar una infección productiva en un cultivo celular. El género Dependovirus incluye AAV, que normalmente infecta a seres humanos (p. ej., serotipos 1, 2, 3A, 3B, 4, 5 y 6) o primates (p. ej., serotipos 1 y 4), y virus relacionados que infectan a otros animales de sangre caliente (p. ej., virus adenoasociados bovinos, caninos, equinos y ovinos). Se describe más

información sobre parvovirus y otros miembros de los Parvoviridae en Kenneth I. Berns, "Parvoviridae: The Viruses and Their Replication", capítulo 69 en Fields Virology (3ª Ed. 1996). Por conveniencia, la presente invención se ejemplifica y se describe adicionalmente en el presente documento tomando como referencia AAV. Sin embargo, debe entenderse que la invención no se limita a AAV, sino que puede aplicarse igualmente a otros parvovirus.

5 La organización genómica de todos los serotipos de AAV conocidos es muy similar. El genoma de AAV es una molécula de ADN monocatenario lineal que tiene menos de aproximadamente 5000 nucleótidos (nt) de longitud. Unas repeticiones terminales invertidas (ITR) flanquean las secuencias de nucleótidos codificantes únicas de las proteínas de replicación no estructurales (Rep) y las proteínas estructurales (VP). Las proteínas VP (VP1, -2 y -3) forman la cápside. Los 145 nt terminales son autocomplementarios y se organizan de forma que pueda formarse una doble cadena intramolecular energéticamente estable que forma una horquilla con forma de T. Estas estructuras en horquilla actúan como origen para la replicación de ADN vírico, actuando como cebadores para el complejo de la ADN polimerasa celular. Después de la infección por AAV de tipo silvestre (ts) de células de mamífero, se expresan los genes de Rep (es decir, los que codifican las proteínas Rep78 y Rep52) a partir del promotor P5 y el promotor P19, respectivamente, y ambas proteínas Rep tienen una función en la replicación del genoma vírico. Un acontecimiento de corte y empalme en el ORF de Rep da lugar, de hecho, a la expresión de cuatro proteínas Rep (es decir, Rep78, Rep68, Rep52 y Rep40). Sin embargo, se ha mostrado que el ARNm no sometido a corte y empalme, que codifica las proteínas Rep78 y Rep52, en células de mamífero, es suficiente para la producción del vector de AAV. También son suficientes las proteínas Rep78 y Rep52 para la producción del vector de AAV en células de insecto.

10 En un AAV adecuado para su uso como vector de terapia génica, el genoma del vector comprende normalmente un ácido nucleico para empaquetar para su suministro a una célula diana. Según esta realización particular, la secuencia de nucleótidos heteróloga se localiza entre las ITR víricas en cualquier extremo del genoma del vector. En realizaciones preferidas adicionales, se eliminan del genoma molde (y, por tanto, del ADN del virión producido a partir del mismo) los genes cap de parvovirus (p. ej., AAV) y los genes rep de parvovirus (p. ej., AAV). Esta configuración maximiza el tamaño de la secuencia o secuencias de ácido nucleico que pueden ser portadas por la cápside del parvovirus.

15 Según esta realización particular, el ácido nucleico se localiza entre las ITR víricas en cualquier extremo del sustrato. Es posible que un genoma parvovírico actúe solo con una ITR. Por tanto, en un vector de terapia génica de la invención basado en un parvovirus, el genoma del vector está flanqueado por al menos una ITR, pero, más habitualmente, por dos ITR de AAV (en general, una en cada extremo del genoma del vector, es decir, una en el extremo 5' y la otra en el extremo 3'). Puede haber secuencias intermedias entre el ácido nucleico en el genoma del vector y una o más de las ITR.

20 Preferentemente, la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de preproinsulina funcional (para la expresión en la célula de mamífero) se incorporará en un genoma parvovírico localizado entre dos ITR regulares o localizado en cualquier extremo de una ITR obtenida por ingeniería genética con dos regiones D.

25 Las secuencias de AAV que pueden usarse en la presente invención para la producción de vectores de terapia génica de AAV pueden proceder del genoma de cualquier serotipo de AAV. En general, los serotipos de AAV tienen secuencias genómicas de homología significativa a niveles de los aminoácidos y del ácido nucleico, proporcionan un conjunto idéntico de funciones genéticas, producen viriones que son esencialmente física y funcionalmente equivalentes, y se replican y ensamblan por mecanismos prácticamente idénticos. Para la secuencia genómica de los diversos serotipos de AAV y una visión de conjunto de las similitudes genómicas, véase, p. ej., número de referencia de GenBank U89790; número de referencia de GenBank J01901; número de referencia de GenBank AF043303; Número de referencia de GenBank AF085716; Chiorini *et al*, 1997; Srivastava *et al*, 1983; Chiorini *et al*, 1999; Rutledge *et al*, 1998; y Wu *et al*, 2000. En la presente invención se puede usar AAV de serotipo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9. Sin embargo, los serotipos de AAV 1, 5 u 8 son fuentes preferidas de secuencias de AAV para su uso en el contexto de la presente invención. En algunas realizaciones, se prefiere el serotipo 8. Las secuencias de los serotipos de AAV pueden mutarse o modificarse por ingeniería genética cuando se utilicen en la producción de vectores para terapia génica.

30 Preferentemente, las secuencias de ITR de AAV para su uso en el contexto de la presente invención proceden de AAV1, AAV2, AAV4 y/o AAV6. Asimismo, las secuencias codificantes de Rep (Rep78 y Rep52) proceden preferentemente de AAV1, AAV2, AAV4 y/o AAV6. Las secuencias codificantes de las proteínas de la cápside VP1, VP2 y VP3 para su uso en el contexto de la presente invención, sin embargo, pueden proceder de cualquiera de los 42 serotipos conocidos, más preferentemente de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8 o AAV9 o de partículas de tipo AAV de reciente creación obtenidas, por ejemplo, mediante técnicas de redistribución de cápsides y bibliotecas de cápsides de AAV.

35 Las secuencias de ITR y Rep de AAV están particularmente conservadas entre la mayoría de serotipos. Las proteínas Rep78 de diversos serotipos de AAV, p. ej., tienen una identidad mayor del 89 % y la identidad de las secuencias de nucleótidos totales a nivel del genoma entre AAV2, AAV3A, AAV3B y AAV6 es de aproximadamente 82 % (Bantel-Schaal *et al*, 1999). Por otra parte, se sabe que las secuencias de Rep y las ITR de muchos serotipos de AAV complementan de forma cruzada (es decir, sustituyen funcionalmente) eficazmente las secuencias correspondientes

de otros serotipos en la producción de partículas de AAV en células de mamífero. El documento US 2003148506 señala que las secuencias de Rep e ITR de AAV también complementan de forma cruzada eficazmente otras secuencias de Rep e ITR de AAV en células de insectos.

5 Se sabe que las proteínas VP de AAV determinan el tropismo celular del virión de AAV. Las secuencias que codifican proteínas VP están significativamente menos conservadas que los genes y las proteínas Rep entre diferentes serotipos de AAV. La capacidad de las secuencias de Rep e ITR de complementar de forma cruzada las secuencias correspondientes de otros serotipos permite la producción de partículas de AAV seudotipificadas que comprenden proteínas de la cápside de un serotipo (p. ej., AAV1, 5 u 8) y las secuencias de Rep y/o ITR de otro serotipo de AAV  
10 (p. ej., AAV2). Dichas partículas de rAAV seudotipificadas forman parte de la presente invención.

En el contexto de la presente invención también pueden utilizarse secuencias de "AAV" modificadas, p. ej., para la producción de vectores de terapia génica de AAV. Dichas secuencias modificadas, que incluyen, p. ej., secuencias que tienen al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 % o más identidad de secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos (p. ej., una secuencia que tiene aproximadamente 75-99 % de identidad de secuencia de nucleótidos) con una ITR, Rep o VP de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8 o AAV9 se pueden usar en lugar de secuencias de ITR, Rep o VP de AAV de tipo silvestre.  
15

Aunque es similar a otros serotipos de AAV en muchos aspectos, AAV5 difiere de otros serotipos de AAV de simio y humanos en mayor medida que otros serotipos de simio y humanos conocidos. En vista de esto, la producción de rAAV5 puede diferir de la producción de otros serotipos en células de insecto. Cuando se emplean métodos de la invención para producir rAAV5, se prefiere que una o más construcciones comprendan, colectivamente en el caso de más de una construcción, una secuencia de nucleótidos que comprende una ITR de AAV5, una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia codificante de Rep de AAV5 (es decir, una secuencia de nucleótidos comprende una Rep78 de AAV5). Dichas secuencias de ITR y Rep pueden modificarse según se desee para obtener una producción eficaz de vectores de AAV5 o vectores de AAV5 seudotipificados. Por ejemplo, puede modificarse el codón de inicio de las secuencias de Rep, pueden modificarse o eliminarse sitios de corte y empalme de VP y/o puede modificarse el codón de inicio de VP1 y nucleótidos cercanos para mejorar la producción de vectores de AAV5.  
20  
25

Por tanto, la cápside vírica utilizada en la invención puede proceder de cualquier parvovirus, bien de un parvovirus autónomo o de un dependovirus, como se ha descrito anteriormente. Preferentemente, la cápside vírica es una cápside de AAV (p. ej., cápside de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5 o AAV6). En general, se prefiere la cápside de AAV1 o la cápside de AAV6. La elección de la cápside de parvovirus se puede basar en varias consideraciones conocidas en la técnica, p. ej., el tipo celular diana, el nivel de expresión deseado, la naturaleza de la secuencia de nucleótidos heteróloga para expresar, problemas relacionados con la producción vírica y similares. Por ejemplo, la cápside de AAV1 y AAV6 puede emplearse provechosamente para músculo esquelético; AAV1, AAV5 y AAV8 para el hígado y células del sistema nervioso central (p. ej., cerebro); AAV5 para células de las vías respiratorias y pulmón o cerebro; AAV3 para células de médula ósea; y AAV4 para células particulares en el cerebro (p. ej., células epiteliales coroides).  
30  
35

Está dentro de las habilidades técnicas del experto seleccionar el virus, subtipo de virus o serotipo de virus más adecuado. Algunos subtipos o serotipos pueden ser más adecuados que otros para un determinado tipo de tejido.  
40

Por ejemplo, puede inducirse provechosamente expresión específica de hígado de un ácido nucleico de la invención mediante la transducción mediada por AAV de células hepáticas. El hígado es susceptible de transducción mediada por AAV y pueden usarse diferentes serotipos (por ejemplo, AAV1, AAV5 o AAV8). En algunas realizaciones, se prefiere AAV8. Puede realizarse transducción del músculo mediante la administración de un AAV que codifica un ácido nucleico a través del torrente sanguíneo. Por tanto, es aplicable la administración intravenosa o intraarterial.  
45

Un vector de terapia génica de parvovirus preparado según la invención puede ser una partícula "híbrida" en la que las TR víricas y la cápside vírica son de parvovirus diferentes. Preferentemente, las TR víricas y la cápside son de diferentes serotipos de AAV. Asimismo, el parvovirus puede tener una cápside "quimérica" (p. ej., que contiene secuencias de diferentes parvovirus, preferentemente diferentes serotipos de AAV) o una cápside "dirigida" (p. ej., un tropismo dirigido).  
50

En el contexto de la invención, se entiende que "al menos una secuencia de nucleótidos de ITR parvovírica" significa una secuencia palindrómica, que comprende principalmente secuencias ordenadas de forma simétrica complementarias, también denominadas regiones "A", "B" y "C". La ITR actúa como un origen de replicación, un sitio que tiene una función en "cis" en la replicación, es decir, que es un sitio de reconocimiento para proteínas de replicación de acción en trans tales como, p. ej., Rep 78 (o Rep68), que reconocen las secuencias palindrómicas y específicas internas al palíndromo. Una excepción a la simetría de la secuencia de ITR es la región "D" de la ITR. Esta es especial (al no tener un complemento dentro de una ITR). El corte del ADN monocatenario tiene lugar en la unión entre las regiones A y D. Es la región donde se inicia la síntesis de ADN nuevo. La región D normalmente se sitúa en un lado del palíndromo y proporciona direccionalidad a la etapa de replicación del ácido nucleico. Un parvovirus que se replica en una célula de mamífero tiene normalmente dos secuencias de ITR. Es posible, sin embargo, modificar por ingeniería genética una ITR de manera que los sitios de unión estén en las dos cadenas de las regiones A y las regiones D estén  
55  
60  
65

localizadas simétricamente, una en cada lado del palíndromo. En un molde de ADN bicatenario circular (p. ej., un plásmido), después se produce la replicación de ácido nucleico asistida por Rep78 o Rep68 en ambas direcciones y una sola ITR es suficiente para la replicación parvovírica de un vector circular. Por tanto, en el contexto de la presente invención se puede usar una secuencia de nucleótidos de ITR. Preferentemente, sin embargo, se usan dos, u otro número par, de ITR regulares. Lo más preferentemente, se usan dos secuencias de ITR. Una ITR parvovírica preferida es una ITR de AAV. Por razones de seguridad, puede ser deseable construir un vector parvovírico (AAV) que no pueda propagarse adicionalmente después de la introducción inicial en una célula. Dicho mecanismo de seguridad para limitar la propagación de un vector indeseable en un receptor puede proporcionarse usando AAV con una ITR quimérica como se describe en el documento US 2003148506.

Los expertos en la materia apreciarán que la proteína o proteínas Rep víricas usadas para producir un vector de AAV de la invención pueden seleccionarse teniendo en cuenta la fuente de las ITR víricas. Por ejemplo, la ITR de AAV5 interacciona normalmente de manera más eficaz con la proteína Rep de AAV5, aunque no es necesario que el serotipo de ITR y la proteína o proteínas Rep coincidan.

La o las ITR utilizadas en la invención son normalmente funcionales, es decir, pueden resolverse completamente y preferentemente son secuencias de AAV, siendo preferidos los serotipos 1, 2, 3, 4, 5 o 6. No es necesario que las ITR de AAV resolubles según la presente invención tengan una secuencia de ITR de tipo silvestre (p. ej., una secuencia de tipo silvestre puede alterarse mediante inserción, supresión, truncamiento o mutaciones de sentido erróneo), siempre que la ITR medie en las funciones deseadas, p. ej., empaquetamiento vírico, integración y/o rescate de provirus, y similares.

Provechosamente, mediante el uso de un vector de terapia génica en comparación con enfoques previos, la restauración de la síntesis de proteínas, es decir, síntesis de insulina, es una característica que las células transducidas adquieren permanentemente o durante un periodo de tiempo prolongado, evitando de este modo la necesidad de administración continua para lograr un efecto terapéutico.

Por consiguiente, los vectores de la invención representan por lo tanto una herramienta para el desarrollo de estrategias para la administración *in vivo* de una secuencia de nucleótidos de insulina, mediante la modificación por ingeniería genética del ácido nucleico dentro de un vector de terapia génica que transduce eficazmente un tipo celular adecuado, tal como una célula hepática.

El vector puede ser un vector autocomplementario o un vector monocatenario. En algunas realizaciones, el vector es un vector monocatenario.

El vector puede comprender además una cola de poli A. Preferentemente, esta se sitúa corriente abajo de la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína preproinsulina funcional.

El vector puede comprender otros elementos para permitir que se exprese la proteína preproinsulina funcional. Dichos vectores son bien conocidos por un experto en la materia.

Preferentemente, se aíslan los ácidos nucleicos descritos anteriormente.

Un experto en la materia estaría capacitado para producir las moléculas de ácido nucleico descritas anteriormente. Esto podría hacerse, por ejemplo, usando síntesis química de una secuencia dada.

Además, una persona experta podría determinar fácilmente si un ácido nucleico expresa una proteína funcional. Para los expertos en la materia resultarán evidentes métodos adecuados. Por ejemplo, un método *in vitro* adecuado implica insertar el ácido nucleico en un vector, tal como un vector lentivírico o un vector de AAV, transducir células hospedadoras, tales como células 293T o HeLa, con el vector, y analizar la actividad de la insulina. Como alternativa, un método *in vivo* adecuado implica transducir un vector que contiene el ácido nucleico en un modelo animal para la diabetes y analizar la insulina funcional en el plasma del animal. Además, se describen con más detalle a continuación métodos adecuados.

El ácido nucleico puede ser cualquier tipo de ácido nucleico compuesto por nucleótidos. El ácido nucleico debe poder expresarse de manera que se produzca una proteína. Preferentemente, el ácido nucleico es ADN o ARN.

La invención también proporciona una célula hospedadora que comprende una cualquiera de las moléculas de ácido nucleico o vectores descritos anteriormente. Preferentemente, el vector es capaz de expresar la secuencia de nucleótidos de insulina en el hospedador. El hospedador puede ser cualquier hospedador adecuado.

Como se usa en el presente documento, el término "hospedador" se refiere a organismos y/o células que albergan una molécula de ácido nucleico o un vector de la invención, así como organismos y/o células que son adecuadas para su uso en la expresión de un gen o proteína recombinante. No se pretende limitar la presente invención a ningún tipo particular de célula u organismo. De hecho, se contempla que en la presente invención encontrará utilidad como hospedador cualquier organismo y/o célula adecuados. Una célula hospedadora puede estar en forma de una sola

célula, una población de células similares o diferentes, por ejemplo, en forma de un cultivo (tal como un cultivo líquido o un cultivo en un sustrato sólido), un organismo o parte del mismo.

5 Una célula hospedadora según la invención puede permitir la expresión de una molécula de ácido nucleico de la invención. Por tanto, la célula hospedadora puede ser, por ejemplo, una célula bacteriana, de levadura, de insecto o de mamífero.

10 Además, la invención proporciona un animal transgénico no humano que comprende células que comprenden la molécula de ácido nucleico que codifica una proteína preproinsulina funcional descrita anteriormente o un vector descrito anteriormente. Preferentemente, el animal es un mamífero no humano, especialmente un primate. Como alternativa, el animal puede ser un roedor, especialmente un ratón; o puede ser canino, felino, ovino o porcino.

15 En un aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una molécula de ácido nucleico o un vector de la invención y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. El o los excipientes incluyen vehículos, diluyentes y/u otros agentes medicinales, agentes farmacéuticos o adyuvantes, etc.

20 La descripción también proporciona un método para tratar la diabetes, en particular, la diabetes de tipo I, comprendiendo el método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un vector como se ha descrito anteriormente a un paciente que padece diabetes. Preferentemente, el paciente es un ser humano.

25 Cuando la diabetes se "trata" con el método anterior, esto significa que se alivian uno o más síntomas de la diabetes. No significa que se eliminen completamente los síntomas de la diabetes de manera que ya no estén presentes en el paciente, aunque en algunos métodos, esto puede ocurrir. El método de tratamiento da lugar a que uno o más de los síntomas de la diabetes sean menos graves que antes del tratamiento.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad que es eficaz, a las dosis y durante los periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico deseado, tal como elevar el nivel de insulina en un sujeto (para conducir a la producción de insulina a un nivel suficiente para aliviar los síntomas de la diabetes).

30 La administración de un ácido nucleico o vector de la invención en una célula hospedadora *in vivo* puede dar lugar a un aumento de la insulina en el hospedador, por ejemplo, a un nivel que alivie uno o más síntomas de la diabetes.

35 Además, la invención proporciona la molécula de ácido nucleico que codifica una proteína preproinsulina funcional como se ha descrito anteriormente, o un vector como se ha descrito anteriormente para su uso en terapia, por ejemplo, en el tratamiento de la diabetes.

40 Además, la invención proporciona el uso de la molécula de ácido nucleico que codifica una proteína preproinsulina funcional como se ha descrito anteriormente o un vector como se ha descrito anteriormente en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la diabetes.

45 La descripción también proporciona un método para la administración de una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína preproinsulina funcional a un sujeto, método que comprende administrar a dicho sujeto una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína preproinsulina funcional como se ha descrito anteriormente o un vector como se ha descrito anteriormente.

50 En la descripción anterior, el término "identidad" se usa para hacer referencia a la similitud de dos secuencias. A efectos de la presente invención, se define aquí que, para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de nucleótidos, las secuencias se alinean con fines de comparación óptima (p. ej., pueden introducirse huecos en la secuencia de un primer ácido nucleico para alineamiento óptimo con una segunda secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico). Después se comparan los restos de nucleótido en las posiciones de nucleótidos. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo resto de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias está en función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de identidad = número de posiciones idénticas/número total de posiciones (es decir, posiciones solapantes) x 100).  
55 Preferentemente, las dos secuencias tienen la misma longitud. Normalmente se lleva a cabo una comparación de secuencias a lo largo de toda la longitud de las dos secuencias que se comparan.

60 El experto en la materia será consciente del hecho de que se dispone de varios programas informáticos diferentes para determinar la identidad entre dos secuencias. Por ejemplo, puede realizarse una comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias usando un algoritmo matemático. En una realización preferida, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de ácido nucleico se determina usando el software de alineación de secuencias Clone Manager 9 (software Sci-Ed - [www.scied.com](http://www.scied.com)) usando alineación global de ADN; parámetros: ambas cadenas; matriz de puntuación: lineal (emparejamiento incorrecto 2, hueco abierto 4, ext. de hueco 1).

65 Como alternativa, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos o de ácido nucleico se puede



determinar usando el algoritmo de Needleman y Wunsch (1970) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de software Accelrys GCG (disponible en <http://www.accelrys.com/products/gcg/>), usando una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250 y un peso de hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

5 Un experto en la materia apreciará que todos los aspectos de la invención, estén relacionados con, por ejemplo, el ácido nucleico, el vector, la célula hospedadora o el uso, son igualmente aplicables a todos los demás aspectos de la invención. Algunos aspectos del método de tratamiento, por ejemplo, la administración del ácido nucleico o vector, pueden haberse descrito con más detalle que en algunos de los otros aspectos de la invención, por ejemplo, en relación con el uso del ácido nucleico o vector para tratar la diabetes. Sin embargo, el experto en la materia apreciará cuando se ha proporcionado información más detallada para un aspecto particular de la invención que, en general, esta información es igualmente aplicable a otros aspectos de la invención. Además, el experto en la materia también apreciará que la descripción en relación con el método de tratamiento es igualmente aplicable al uso del ácido nucleico o vector en el tratamiento de la diabetes.

## 15 Descripción detallada de la invención

La invención se describirá ahora en detalle a modo de ejemplo solo con referencia a las figuras en las que:

20 La figura 1 muestra la conversión de proinsulina en insulina activa. La insulina activa tiene 35 aminoácidos menos que la proinsulina; 4 se eliminan por completo y los 31 restantes forman el péptido C. El péptido C se extrae del centro de la secuencia de proinsulina; los otros dos extremos (la cadena A y la cadena B) permanecen conectados por enlaces disulfuro y forman la molécula de insulina activa.

25 La figura 2 es un mapa del plásmido utilizar para generar el vector de AAV8 que codifica la preproinsulina de codones optimizados de la presente invención.

30 La figura 3 muestra datos de C56BL6. La eficacia de rAAV-HLP-hINS y rAAV-HLP-hINSco se probó inicialmente en ratones C57BL6 en dosis de  $1 \times 10^{10}$  (baja) y  $1 \times 10^{11}$  (alta) de vg/ratón. Se descubrió que los niveles de glucosa el día 14 después de la inyección eran significativamente menores en ratones transducidos con rAAV-HLP-hINSco, lo que condujo a acontecimientos hipoglucemiantes. Se registró una expresión significativa de insulina medida por los niveles de péptido C en ratones transducidos con ambos vectores.

35 La figura 4 muestra datos de ratones NSG. (A) Niveles de glucosa en ayunas (B) Peso corporal de ratones en los que se inyectaron  $1 \times 10^{11}$  vg/ratón [azul],  $1 \times 10^{10}$  vg/ratón [gris] de virus ssAAV8-HLP-hINS, controles diabéticos [rojo] y controles sanos [verde]. (C) Niveles de péptido C humano en suero medidos en los puntos temporales indicados después de la inyección del virus (D) Comparación de los niveles de glucosa en sangre sin ayuno y con 16 horas de ayuno de ratones AAV8-HLP-hINS (morado, n = 5), diabéticos (rojo, n = 4) y sanos (verde, n = 4) a los que se han inyectado dosis de  $1 \times 10^{10}$  vg/ratón, 75 días después de la inyección del virus. Los datos se expresan como la media  $\pm$  ET. \*p = 0,031, \*\*p < 0,0001.

40 La figura 5 muestra datos de ratones NSG. (A) Glucosa en sangre sin ayuno de ratones diabéticos a los que se han inyectado dosis altas ( $7,5 \times 10^{10}$  vg/ratón) [círculos, n = 5], medianas ( $5 \times 10^{10}$  vg/ratón) [cuadrados, n = 5] y bajas ( $2,5 \times 10^{10}$  vg/ratón) [triángulos, n = 5] del vector ssAAV-HLP-hINS [azul] o del vector ssAAV-HLP-hINSco con codones optimizados [morado] en comparación con controles sanos [verde, n = 4] y diabéticos [rojo, n = 5] (B) Peso corporal de ratones diabéticos a los que se han inyectado dosis altas, medianas y bajas del vector ssAAV-HLP-hINS o ssAAV-HLP-hINSco con codones optimizados [morado] en comparación con controles sanos y diabéticos. (C) Representación ampliada del cuadro en la figura (A) que representa los niveles de glucosa en sangre sin ayuno de ratones inyectados con codones optimizados (D) Peso corporal de ratones a los que se ha inyectado ssAAV-HLP-hINSco con codones optimizados. (E) Serie separada de experimentos que representan la glucosa en sangre de ratones a los que se han inyectado dosis altas ( $1 \times 10^{10}$  vg/ratón) [círculos, n = 4], medianas ( $5 \times 10^9$  vg/ratón) [cuadrados, n = 4] y bajas ( $1 \times 10^9$  vg/ratón) [triángulos, n = 4] del vector AAV-HLP-hINSco con codones optimizados. Se incluyeron como controles ratones diabéticos no tratados (rojo, n = 4) y ratones sanos (verde, n = 4). (F) Peso corporal de ratones a los que se han inyectado dosis respectivas. Los resultados se muestran como medias  $\pm$  ET.

## 55 Sumario

60 Los inventores han probado inicialmente la eficacia del virus adenoasociado de serotipo 8 (AAV-8) que contiene el gen de proinsulina humana en formas de tipo silvestre y con codones optimizados en ratones C57BL6 sanos. También informan sobre el tratamiento de ratones NSG diabéticos inmunodeprimidos con estreptozotocina (STZ). Se administraron diversas dosis del vector de tipo silvestre usando una inyección intravenosa en ratones NSG diabéticos, con ratones normales y ratones diabéticos sin tratar como controles. Se observó reducción de los niveles de azúcar en sangre, aumento de peso y bienestar general de los animales en los intervalos de dosis más altos. Sin embargo, después de una respuesta inicial, 10 días después de la inyección, los animales se volvieron hipoglucémicos. En los experimentos de dosis más bajas, hubo un ligero aumento de peso, pero sin efecto sobre los niveles de azúcar en sangre sin ayuno.

En un segundo conjunto de experimentos similares al anterior en ratones NSG, se utilizó un gen de proinsulina humana con codones optimizados. Hubo al menos un aumento de diez veces en la producción de insulina para un número determinado de partículas víricas. En vista de la gran cantidad de partículas víricas de AAV8 que serían necesarias en cualquier ampliación de este tratamiento para animales grandes, la optimización de codones parecería tener ventajas considerables sobre el vector sin codones optimizados.

## Materiales y métodos

### 10 Vectores de AAV

La secuencia de ADN de tipo silvestre de insulina humana se clonó cadena abajo de un promotor de HLP específico de hígado para obtener rAAV8-HLP-hINS. Las secuencias de ADN en rAAV8-HLP-hINS se modificaron adicionalmente utilizando un algoritmo de optimización de codones desarrollado de manera específica. En total, se cambiaron 50 nucleótidos para que el perfil de uso codónico del gen resultante fuera el mismo que el de la albúmina humana. El ADNc de codop-hINS de 334 pb resultante fue 85 % idéntico al ADNc de insulina humana de tipo silvestre. El ADNc de codop-hINS se sintetizó y se clonó cadena abajo del promotor de HLP.

### 20 *Empaquetamiento, purificación y titulación de virus ssAA V8*

Se prepararon partículas de vectores rAAV-HLP-hINS y rAAV-HLP-hINSco mediante el método de transfección transitoria 293T descrito antes utilizando un plásmido auxiliar adenovírico (HGT1) y un plásmido de empaquetamiento quimérico de AAV2 Rep-8Cap denominado pAAV8-2 para generar partículas de vector seudotipificadas de AAV8 (Davidoff, *et al* 2004, Gao, *et al* 2002).

Los vectores seudotipificados de la cápside del serotipo 8 se purificaron mediante el método de cromatografía de intercambio iónico descrito anteriormente (Gao, *et al* 2002). Las partículas de vector se purificaron, titularon y caracterizaron como se ha descrito en otra parte (Fagone, *et al* 2012). Se utilizaron títulos basados en gel para la dosificación de animales.

### 30 *Animales*

Se obtuvieron ratones reproductores NOD.*cg-Prkdcscid112rgtm1Wjl/SzJ* (NSG) de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, Estados Unidos), se criaron y se mantuvieron en una instalación específica exenta de patógenos. Los protocolos experimentales y de reproducción utilizados están de acuerdo con las directrices del Comité Institucional de Uso y Cuidado de Animales (IACUC) de la Universidad Nacional de Singapur. Los ratones macho NSG (8-12 semanas de edad) recibieron una única inyección intraperitoneal de 120 mg/kg de STZ (Sigma-Aldrich, San Luis, MI, Estados Unidos) para inducir diabetes. Se midió el peso corporal y se obtuvo sangre a través de la vena de la cola y se colocó en tiras reactivas para medir la glucosa en sangre con un glucómetro activo ACCU-CHEK (Roche Diagnostics, Indianápolis, IL, Estados Unidos). Los ratones con niveles de glucosa en sangre >20 mM durante 4 días consecutivos se consideraron diabéticos. Los vectores ssAAV8-HLP-hINS y ssAAV8-HLP-hINSco se inyectaron mediante inyección intravenosa en la vena de la cola con las copias del genoma (CG) especificadas por ratón. Se obtuvo sangre en los puntos temporales indicados después de la inyección de AAV y en el punto final antes de la eutanasia.

### 45 *ELISA de péptido C*

La cantidad de péptido C en la muestra de suero se midió utilizando un kit de ELISA para péptido C humano (kit ELISA de péptido C humano (EZHCP-20K); Millipore, Billerica, MA) según los protocolos del fabricante.

### 50 *Ensayo de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (IPGTT)*

La prueba de tolerancia a la glucosa mide la eliminación del cuerpo de una carga de glucosa inyectada por vía intraperitoneal. Los animales se mantuvieron en ayunas durante aproximadamente 16 horas (o el tiempo indicado), se determinaron los niveles de glucosa en sangre en ayunas antes de administrar una solución de glucosa (2 g/kg de peso corporal; solución de glucosa al 20 % p/v, o lo que se indique) mediante inyección intraperitoneal (IP). El grupo de ratones a los que se inyectaron dosis más altas de AAV no se sometió a ayuno durante una noche porque los niveles de glucosa en sangre ya eran bajos. Se mantuvieron en ayunas durante algunas horas (como se indica) antes de la inyección de glucosa. Posteriormente, se midió el nivel de glucosa en sangre en diferentes puntos temporales (normalmente 7,5, 15, 30, 45 y 60 minutos). Se realizó una prueba de t para datos emparejados entre los grupos de tratamiento y de control.

### *Análisis inmunohistoquímicos (IHC)*

65 Se extirparon tejidos de hígado y páncreas de ratones sacrificados, se fijaron en una solución de formaldehído al 4 % y se incluyeron en parafina. Se realizó recuperación del antígeno en las secciones de tejido de 5 µm y se incubaron

con anticuerpo anti-insulina (n.º de cat.) a 4 °C durante una noche. Se realizó un procedimiento de tinción utilizando el sistema de detección Ultra-vision-One (Thermo Fisher) según el protocolo del fabricante.

#### *Análisis estadísticos*

- 5 El número de animales utilizados en cada grupo se indicó en las respectivas leyendas de las figuras. Todos los valores se expresan como medias  $\pm$  ET. La significación estadística se determinó mediante pruebas de ANOVA y los valores de  $P < 0,05$  se consideraron significativos.

## 10 RESULTADOS

Los estudios iniciales se diseñaron para comparar los efectos de la optimización de codones de la secuencia codificante de la insulina humana utilizando dos vectores de rAAV monocatenarios (mc) que contenían secuencias de insulina de tipo silvestre o de codones optimizados bajo el control del promotor de HLP de los inventores previamente descrito (Nathwani *et al.*, 2006). Ambos casetes de expresión de ssAAV-hINS se empaquetaron con la cápside del serotipo 8 utilizando un método convencional de transfección transitoria HEK293T, siendo la eficacia de producción (~ $1 \times 10^4$  partículas AAV-hFVIII/célula 293T) comparable a la señalada previamente para los vectores AAV-hFIX (Nathwani *et al.*, 2006). La evaluación del ADN vírico extraído de las partículas de vector ssAAV8-HLP-codop-hINS y ssAAV5-HLP-hINS mostró bandas de aproximadamente 1,8 y 3,6 kb en geles de agarosa alcalina, lo que sugiere el empaquetamiento de dímeros mc y autocomplementarios, este último posiblemente formado espontáneamente porque AAV tiene tendencia a empaquetarse a su capacidad máxima (4 kb aproximadamente).

### Datos preliminares en ratones C57BL6

- 25 Se realizaron estudios preliminares de titulación de dosis utilizando  $10^{10}$  y  $10^{11}$  vg/ratón para estimar la eficacia del ssAAV8-HLP-hINS transducido en ratones C57BL6. Los datos mostraron la capacidad de los vectores de insulina de tipo silvestre y con codones optimizados para producir insulina activa y el vector de insulina con codones optimizados para reducir significativamente los niveles de glucosa en sangre incluso en presencia de insulina endógena (figura 3).

### 30 Dosificación de vector sin codones optimizados en ratones NSG diabéticos

Se repitieron estudios preliminares de titulación de dosis utilizando  $10^{10}$  y  $10^{11}$  vg/ratón para estimar la eficacia del ssAAV8-HLP-hINS transducido en los ratones diabéticos (figs. 4A y B). La inyección de dosis alta dio lugar a disminución gradual de los niveles de glucosa en sangre durante las primeras 3 semanas y los animales se volvieron hipoglucémicos después de 7 semanas. Los animales inyectados con dosis bajas permanecieron hiperglucémicos sin ayuno, pero hubo un aumento en el peso corporal a lo largo del tiempo en comparación con los diabéticos de control. Las mediciones de péptido C humano en suero no mostraron péptido C humano detectable en los ratones de control sanos y de control diabéticos, pero mostraron un aumento progresivo en ratones a los que se inyectaron  $1 \times 10^{11}$  y  $1 \times 10^{10}$  vg/ratón cuando se midió a las 1, 3 y 12 semanas (fig. 4C). Con la abstinencia de alimentos, los ratones inyectados con dosis bajas mostraron reducción de los niveles de glucosa en sangre similares a los controles normales en un periodo de 16 horas (fig. 4D) mientras que los ratones diabéticos continuaron siendo hiperglucémicos. El aumento de peso observado en los ratones tratados con dosis bajas, a pesar de la hiperglucemia, y la reducción de la glucosa en sangre después del ayuno de 16 horas son indicios de secreción de insulina de bajo nivel por debajo del umbral de los métodos de detección de glucosa de los inventores.

### 45 Comparación de genes con codones optimizados frente a genes sin codones optimizados en la producción de insulina hepática *in vivo* en ratones NSG diabéticos.

50 En la segunda serie de experimentos, las dosis se refinaron a partir del experimento de la serie 1 y se compararon las eficacias de ssAAV8-HLP-hINS sin codones optimizados con el virus rAAV8-HLP-hINS con codones optimizados.

### Cohortes sin codones optimizados:

55 Los ratones tratados con el virus de dosis alta ( $7,5 \times 10^{10}$  vg/ratón) se volvieron hipoglucémicos aproximadamente 3 semanas después de la inyección. En los experimentos de dosis mediana ( $5 \times 10^{10}$  vg/ratón) y baja ( $2,5 \times 10^{10}$  vg/ratón), la disminución de los niveles de glucosa en sangre se observó gradualmente en una etapa posterior, 20-30 días después de la inyección del vector y permaneció estable durante el periodo de observación de 9 meses.

60 Los ratones tratados con el virus de dosis mediana ( $5 \times 10^{10}$  vg/ratón) fueron levemente hiperglucémicos y la dosis baja ( $2,5 \times 10^{10}$  vg/ratón) permanecieron hiperglucémicos en condiciones sin ayuno (líneas azules, fig. 5A). El peso corporal de los ratones tratados (líneas azules, fig. 5B) se volvió significativamente mayor que el de los controles diabéticos (línea roja, fig. 5B) independientemente de sus niveles de glucosa en sangre y cercano al peso de los controles sanos (línea verde, fig. 5B). Los controles diabéticos tuvieron que ser sacrificados debido a la pérdida masiva de peso corporal (línea roja). Se extrajo suero de los animales supervivientes y se midió el péptido C humano el día 140 después de la inyección del virus. El péptido C humano que se encuentra en el suero de ratones a los que se inyectaron  $5 \times 10^{10}$  vg/ratón y  $2,5 \times 10^{10}$  vg/ratón fue  $2,60 \pm 0,57$  y  $1,2 \pm 0,25$  ng/ml respectivamente, que tiene proporciones

calculadas para que sean directamente proporcionales a las dosis administradas.

### **Cohortes con codones optimizados:**

5 Todos los ratones diabéticos a los que se inyectaron las 3 dosis respectivas de virus con codones optimizados se volvieron hipoglucémicos en un periodo de 10 días (líneas moradas, fig. 5A y ampliado en la fig. 5C) y el peso corporal de los respectivos grupos se presentaron en la fig. 5B y ampliado en la fig. 5D. Hay un aumento del peso corporal de todos los grupos con la disminución de los niveles de glucosa en sangre. Los inventores no están seguros de la razón, pero sospechan que los ratones aumentaron su ingesta de alimentos para contrarrestar el efecto hipoglucemiante provocado por el aumento de la expresión de insulina durante las 3 semanas. Los ratones murieron o tuvieron que ser sacrificados debido a los niveles muy bajos de glucosa en sangre (que varían de 2 a 4 mmol/l) y al estado moribundo. Se redujeron aún más las dosis del virus con codones optimizados a dosis alta  $1 \times 10^{10}$ ; mediana  $5 \times 10^9$  y baja  $1 \times 10^9$  vg/ratón en la tercera serie de experimentos. El perfil de glucosa en sangre sin ayuno y el peso corporal se muestran en las figs. 5E y 5F respectivamente. Se consiguió corrección de glucosa similar a la observada por el vector sin codones optimizados ssAAV8-HLP-hINS mediante una dosis 10-20 veces menor del ssAAV8-HLP-hINS con codones optimizados. Los niveles promedios de péptido C humano obtenidos el día 140 fueron  $2,20 \pm 0,25$  ng/ml en ratones a los que se inyectaron  $5 \times 10^9$  vg/ratón de virus y  $0,36 \pm 0,09$  ng/ml en ratones a los que se inyectaron  $1 \times 10^9$  vg/ratón de virus y la proporción (6:1) es casi directamente proporcional a la de las dos dosis de virus inyectadas (5:1). Los animales de control diabéticos se sacrificaron debido a la grave pérdida de peso y al estado moribundo a los 90 días después de la inyección. Los ratones a los que se inyectaron dosis bajas parecían activos y sanos a pesar del menor aumento de peso a lo largo del tiempo (figs. 5B y 5F) en comparación con los controles sanos y con dosis mediana inyectada, pero tuvieron que ser sacrificados según las pautas de IACUC para una pérdida de peso inaceptable en comparación con los animales sanos después de 150 días.

### **25 Análisis**

Se presentan aquí los resultados de la terapia génica de insulina eficaz para ratones diabéticos tipo 1 inducidos por STZ utilizando un vector AAV de serotipo 8 pseudotipificado, monocatenario, que contiene el promotor específico del hígado (HLP) descrito anteriormente por los inventores [McIntosh *et al*, 2013]. Los experimentos indicados aquí tienen dos características destacadas:

35 1) El tratamiento consistió en una única inyección IV de un vector de AAV8 con el gen de la proinsulina humana. Esta cadena principal del vector AAV8-HLP se ha utilizado previamente con éxito en un ensayo clínico humano de pacientes que padecen hemofilia B. Todos los pacientes del ensayo mostraron expresión del transgén FIX a niveles suficientes para mejorar el fenotipo hemorrágico, con pocos efectos secundarios (Nathwani *et al*, 2014). La seguridad y durabilidad terapéutica (es decir, hasta 4 años) demostrada por el vector de AAV8 en los estudios clínicos en humanos sugeriría que esta estrategia podría tener valor terapéutico para algunos pacientes diabéticos.

40 2) La optimización de codones del gen de la proinsulina humana dio lugar a una reducción de 10 a 20 veces en la dosis de vector necesaria para lograr niveles similares de glucosa en sangre sin ayuno en comparación con el vector sin codones optimizados. Los ratones a los que se inyectaron  $5 \times 10^{10}$  vg/ratón del vector ssAAV8-HLP-hINS tenían perfiles de glucosa en sangre y secreción de péptido C similares a los de la cohorte con codones optimizados en la que se inyectaron con  $5 \times 10^9$  vg/ratón. La secreción de péptido C humano por el vector con codones optimizados es hasta aproximadamente 10 veces mayor que el vector sin codones optimizados *in vivo* medida el día 140 después de la inyección. Se realizaron estrategias de optimización de codones similares en el factor VIII humano logrando un aumento de expresión de 29 a 44 veces, produciendo más del 200 % de los niveles normales de Factor VIII (Ward *et al*, 2011). Los tratamientos en modelos caninos de hemofilia y ensayos clínicos en seres humanos también mostraron pruebas de que dosis menores de AAV introducidas tienen menos probabilidades de inducir respuestas inmunitarias (Nathwani *et al*, 2011, Nathwani *et al*, 2014). Un pequeño número de partículas de vector puede disminuir el riesgo de daño por transaminitis por vector de hepatocitos y reducir los costes de producción del vector. Esto debería facilitar la producción de vector en cantidades suficientes para tratar animales grandes, incluyendo perros que padecen diabetes espontánea y ensayos clínicos en seres humanos.

55 Se ha valorado la dosis de vector ( $10^9$ - $10^{11}$  vg/ratón) que conduce a un espectro de hipoglucemia a hiperglucemia cuando los animales fueron alimentados a voluntad y se han obtenido dosis con un control constante y satisfactorio de la homeostasis de la glucosa con selección de la dosis, evitando estos extremos. En las diversas dosis utilizadas, los inventores se han esforzado por determinar la dosis adecuada,  $5 \times 10^{11}$  vg/ratón para virus sin codones optimizados y  $5 \times 10^{10}$  vg/ratón para virus con codones optimizados, para aproximarse a la euglucemia o ligera hiperglucemia con una dieta normal que no se vea alterada indebidamente durante hasta 8 horas de ayuno. La falta de pruebas de disminución de la secreción prolongada de insulina durante más de 9 meses sugiere que durante este periodo no ha habido silenciamiento génico significativo ni otros mecanismos que inhiban la expresión de insulina, aunque esto deberá abordarse con animales inmunocompetentes en experimentos futuros. El peso de los ratones tratados con ligera hiperglucemia o euglucemia se ha restablecido en el intervalo de los controles sanos y permaneció relativamente estable durante el periodo de 9 meses a 1 año.

65

### **Referencias**

1. Callejas D, *et al.* (2013) *Diabetes*. 62 (5): 1718-29.
2. Davidoff, A. M. *et al.* (2004). *J Virol Methods*, 121, 209-215.
3. Fagone, P. *et al.* (2012) *Hum Gene Ther Methods*, 23, 1-7.
- 5 4. Gao, G. P. *et al.* (2002) *Proc Natl Acad Sci USA*, 99, 11854-11859.
5. McIntosh, J. *et al.* (2013) *Blood*, 121, 3335-3344.
6. Nathwani, A. C. *et al.* (2006). *Blood*, 107 (7), 2653-2661.
7. Nathwani, A. C. *et al.* (2011) *N Engl J Med*, 365, 2357-2365.
8. Nathwani A. C. *et al.* (2014) *N Engl JMed*. 371 (21): 1994-2004.
- 10 9. Ren B. *et al.* *Diabetologia* 50(9): 1910-1920.
10. Ward N. J. *et al.* (2011) *Blood*, 117 (3): 798-807.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 15 <110> UCL Business PLC
- <120> Terapia génica para la diabetes
- <130> P531144PCTJW
- 20 <150> 1517329.7
- <151> 30/09/2015
- <160> 2
- 25 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 333
- 30 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Secuencia de nucleótidos del gen de insulina con codones optimizados
- 35 <400> 1
- atggctcttt ggatgagact gcttcctctg cttgctctgc tggccctctg gggacctgat 60
- cctgctgctg cttttgtgaa tcagcatctg tgcggctccg atcttgtgga agctctgtat 120
- cttgtgtgcg gagaaagagg ctttttttac acaccagga cccgccggga agccgaagac 180
- ctgcaggtgg ggcaggtgga gctgggaggc ggacctggag ccggcagcct gcagcccttg 240
- gccctggagg ggtcccggca gaagcgtggc atcgtggaac agtgctgcac ctccatctgc 300
- tccctgtatc agctggaaaa ttattgcaat tag 333
- 40 <210> 2
- <211> 110
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- 45 <400> 2

ES 2 819 973 T3

Met Ala Leu Trp Met Arg Leu Leu Pro Leu Leu Ala Leu Leu Ala Leu  
 1 5 10 15

Trp Gly Pro Asp Pro Ala Ala Ala Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly  
 20 25 30

Ser Asp Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe  
 35 40 45

Phe Tyr Thr Pro Arg Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly  
 50 55 60

Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu  
 65 70 75 80

Ala Leu Glu Gly Ser Arg Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys  
 85 90 95

Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn  
 100 105 110

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína preproinsulina funcional en donde la secuencia de nucleótidos tiene al menos 89 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO. 1.
2. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, en donde la secuencia de nucleótidos tiene al menos 95 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO. 1.
- 10 3. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, en donde la secuencia de nucleótidos tiene al menos 98 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO. 1.
- 15 4. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1, en donde la secuencia de nucleótidos tiene la secuencia de la SEQ ID NO. 1.
5. La molécula de ácido nucleico de cualquier reivindicación anterior, en donde la secuencia de nucleótidos codifica la preproinsulina humana.
- 20 6. La molécula de ácido nucleico de cualquier reivindicación anterior, en donde la secuencia de nucleótidos codifica una proteína preproinsulina que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 2.
7. Un vector para expresar la proteína preproinsulina, comprendiendo el vector la molécula de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 25 8. El vector de la reivindicación 7 que comprende además un promotor específico del hígado, en donde el promotor es preferentemente un promotor de HLP.
9. El vector de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 8, en donde el vector es un vector de rAAV.
- 30 10. El vector de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en donde el vector es un vector monocatenario.
11. Una célula hospedadora que comprende la molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o el vector de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10.
- 35 12. Un animal transgénico no humano que comprende células que comprenden la molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o el vector de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10.
- 40 13. Una composición farmacéutica que comprende la molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o el vector de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.
14. La molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o el vector de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10 para su uso en terapia.
- 45 15. La molécula de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o el vector de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10 para su uso en el tratamiento de la diabetes.

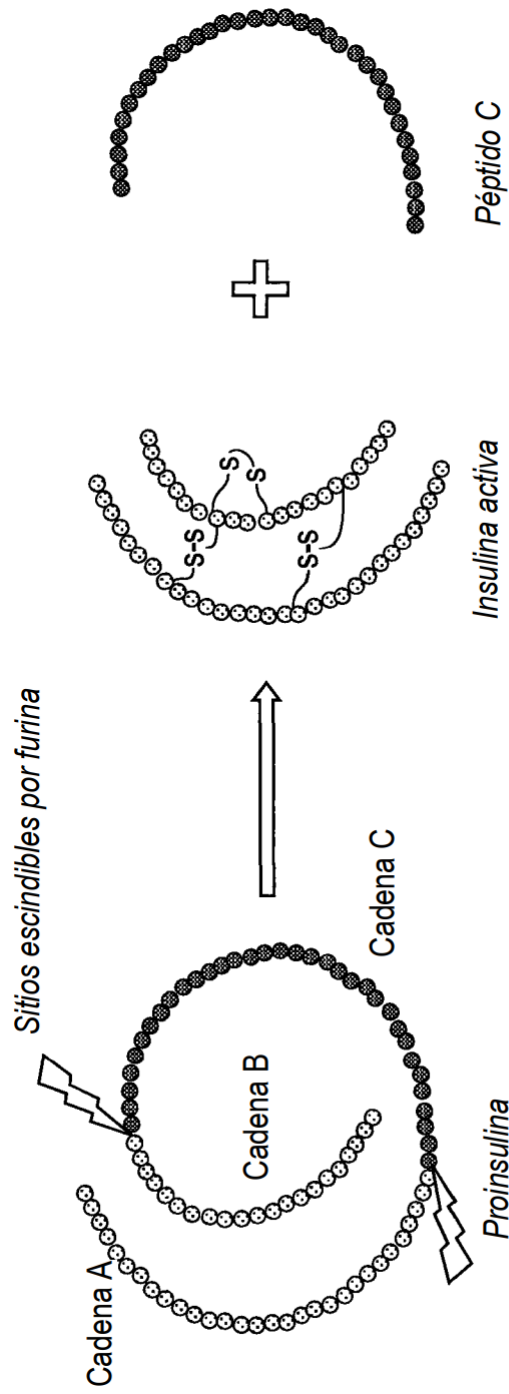


FIG. 1



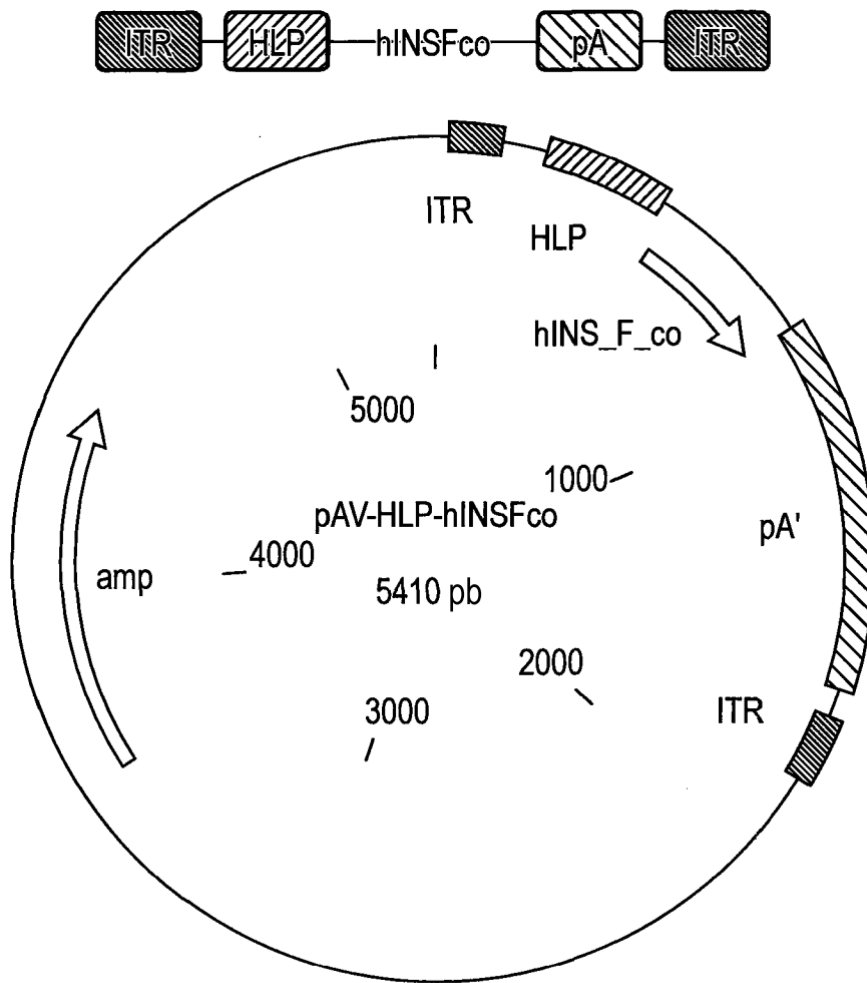
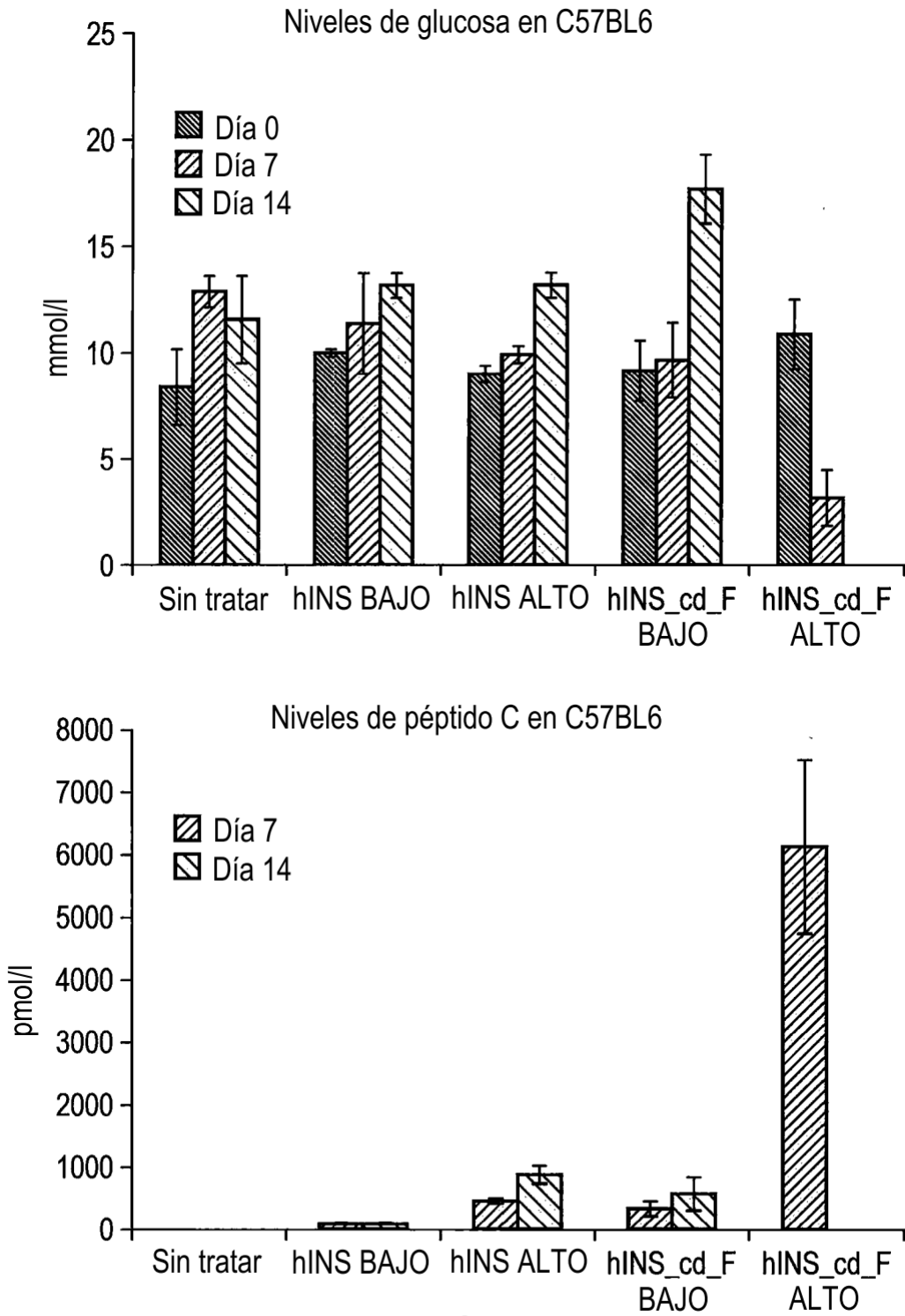


FIG. 2



**FIG. 3**

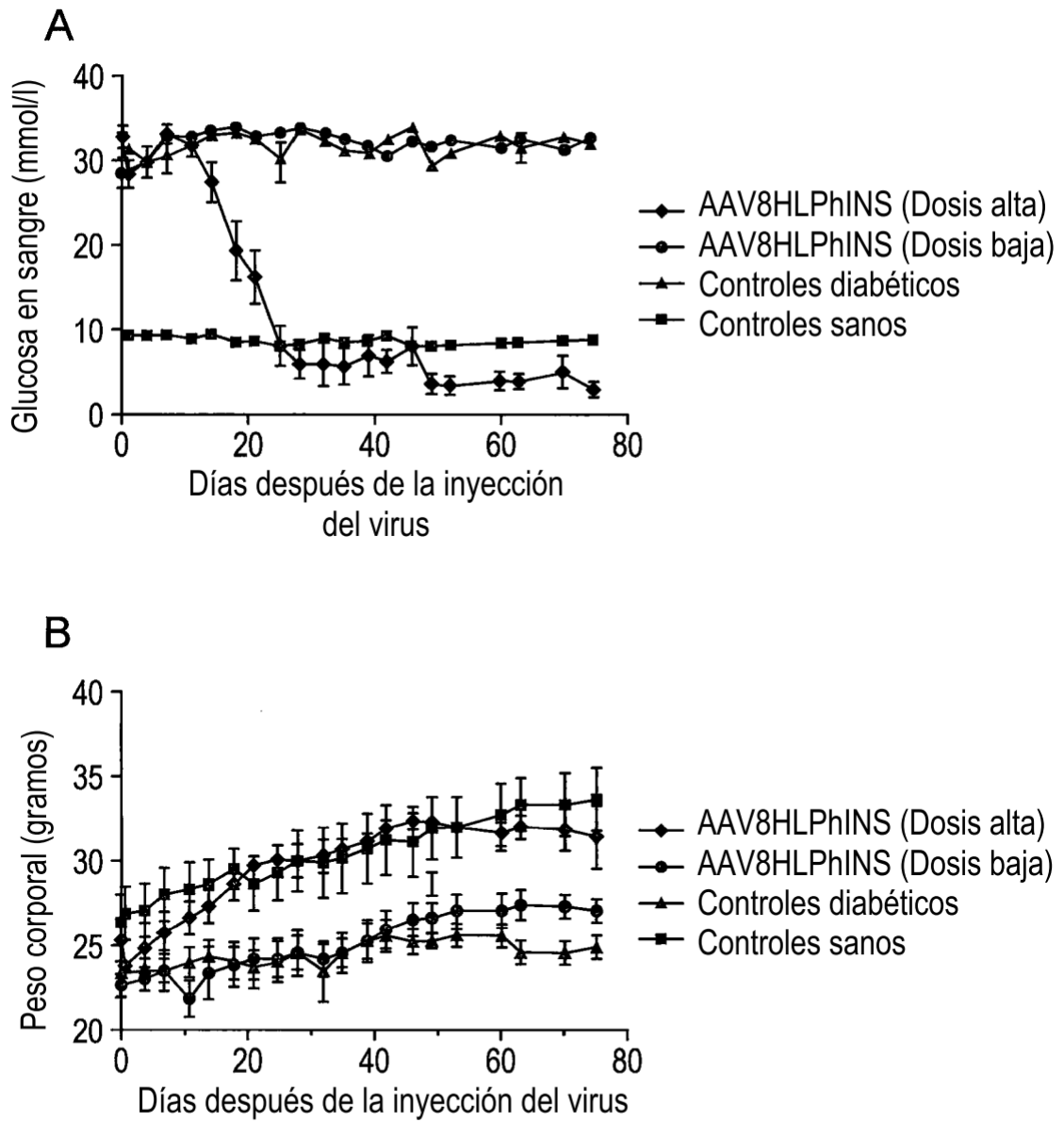


FIG. 4

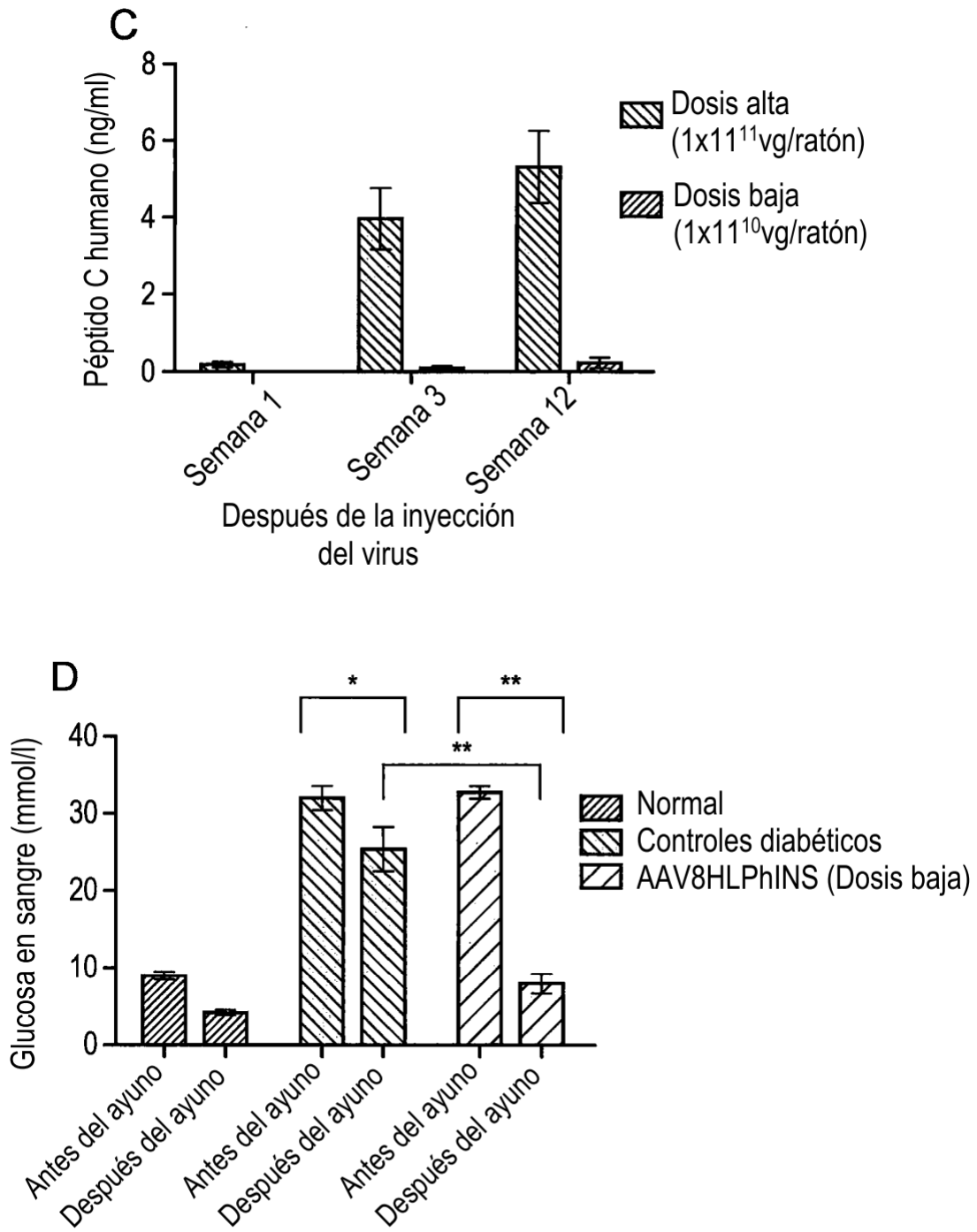
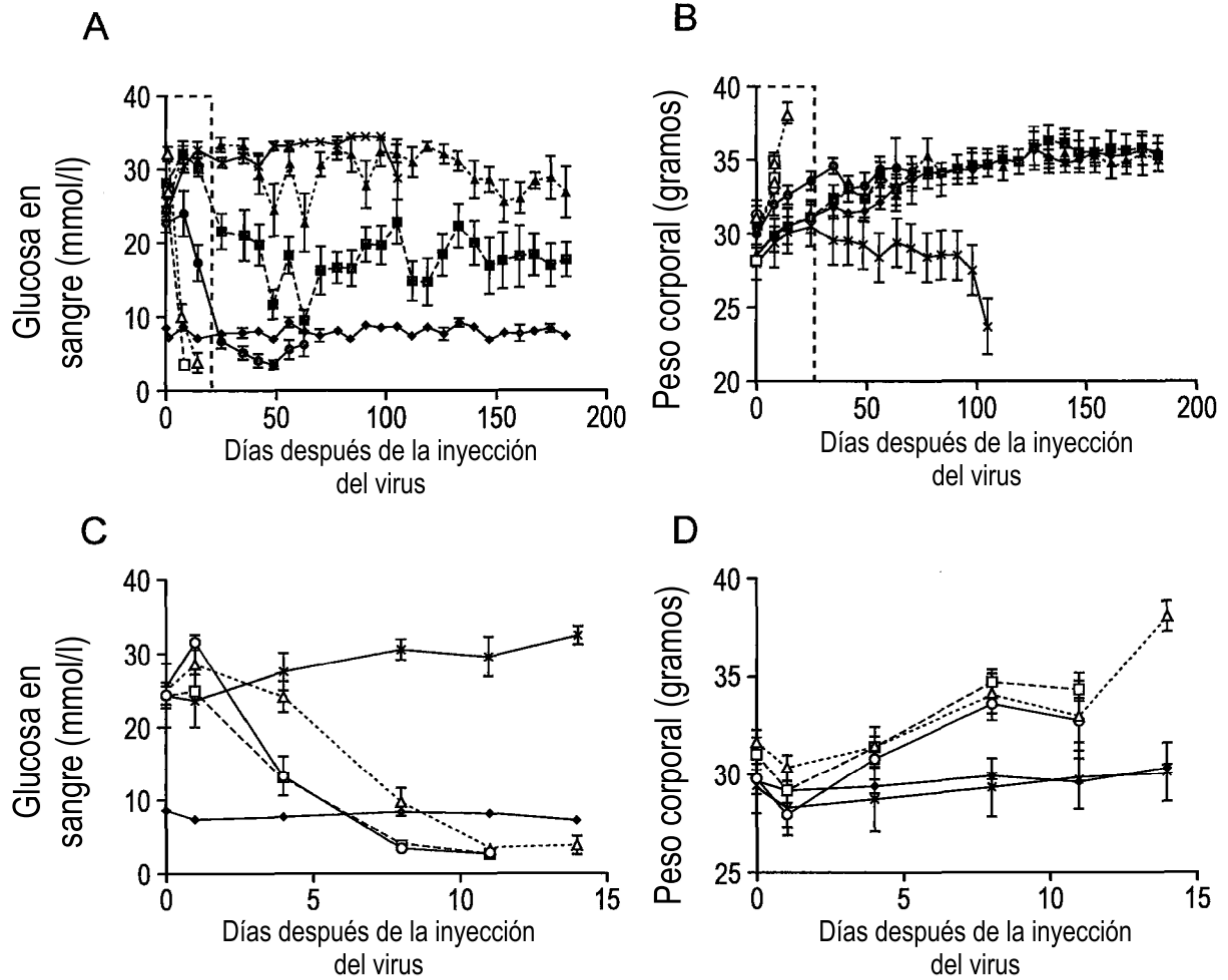


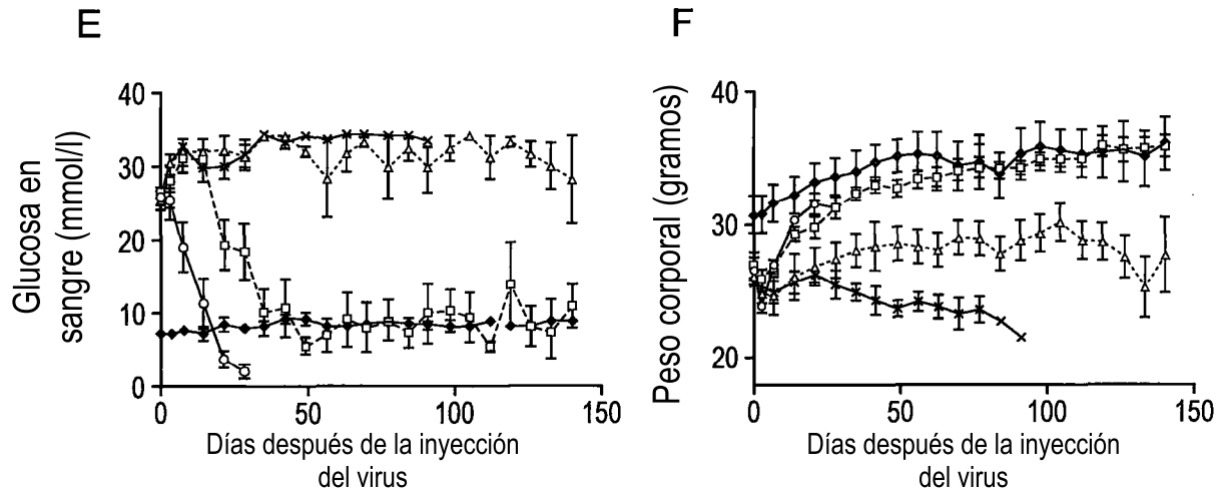
FIG. 4 (continuación)



Leyenda maestra para la 2.<sup>a</sup> serie (Figuras 5A-5D)

- Dosis alta de pAAV-HLP-hIns ( $7,5 \times 10^{10}$ vg/ratón)
- Dosis media de pAAV-HLP-hIns ( $5 \times 10^{10}$ vg/ratón)
- ▲ Dosis baja de pAAV-HLP-hINS ( $2,5 \times 10^{10}$ vg/ratón)
- Dosis alta de pAAV-HLP-hINSco ( $7,5 \times 10^{10}$ vg/ratón)
- Dosis media de pAAV-HLP-hINSco ( $5 \times 10^{10}$ vg/ratón)
- △ Dosis baja de pAAV-HLP-hINSco ( $2,5 \times 10^{10}$ vg/ratón)
- × Controles diabéticos
- ◆ Controles sanos

FIG. 5



Leyenda maestra para la 2.<sup>a</sup> serie (Figuras 5E-5F)

- Dosis alta de pAAV-HLP-hINSco ( $1 \times 10^{10}$ vg/ratón)
- Dosis media de pAAV-HLP-hINSco ( $5 \times 10^9$ vg/ratón)
- △--- Dosis baja de pAAV-HLP-hINSco ( $1 \times 10^9$ vg/ratón)
- \*— Controles diabéticos
- Controles sanos

FIG. 6