

SIB EX6119R

P076698SM:HVA/REC

Traduzione in lingua italiana del Brevetto Europeo

domanda n° 17711290.1, pubblicazione n° 3426795

a nome di: NightstaRx Limited

di Gibbs Building, 215 Euston Road, London NW1 2BE, Regno Unito

“SAGGIO DI PRENILAZIONE”

CAMPO

La presente descrizione riguarda un saggio per l'uso nella determinazione dell'attività della proteina Rab escort 1 (REP1). Più in particolare, la descrizione riguarda l'uso di Rab6a in un saggio come substrato per la prenilazione, in particolare in cui REP1 è stata rilasciata in una cellula usando un vettore di terapia genica.

SFONDO

La coroideremia è una malattia rara che porta alla degenerazione della coroide, epitelio pigmentato retinico e fotorecettori dell'occhio. I maschi affetti tipicamente presentano cecità notturna durante gli anni dell'adolescenza, perdita progressiva di visione periferica durante i 20 e i 30 anni e cecità completa a 40 anni. Le portatrici donna hanno sintomi lievi, più in particolare cecità notturna ma possono occasionalmente avere un fenotipo più grave.

La coroideremia è provocata da mutazioni nel gene *CHM*, che codifica per la proteina Rab escort 1 (REP1). La proteina Rab escort 2 (REP2), che è al 75% omologa a REP1, compensa qualsiasi carenza di REP1 nella maggior parte delle cellule dell'organismo. Ciò porta ad una insufficiente attività della proteina Rab escort a mantenere la prenilazione normale del Rab GTPasi target e genera disfunzione cellulare ed infine la morte cellulare.

La coroideremia può essere trattata con successo fornendo copie funzionali del transgene di REP1 alle cellule dell'occhio (MacLaren, R.E. *et al.* (2014) *Lancet* 383: 1129-37). In particolare, è stato dimostrato che i vettori di terapia genica virus adeno-associati (AAV) possono essere usati per rilasciare una sequenza nucleotidica codificante REP1 funzionale nell'occhio per trattare la malattia.

Poiché la terapia genica della coroideremia è divenuta una realtà clinica, vi è una necessità di saggi affidabili e sensibili per determinare l'attività di REP1 rilasciata in modo esogeno, in particolare per testare nuovi vettori di terapia genica e come screening di controllo di qualità per stock di vettori clinici.

Cremers, F.P. *et al.* (1994) *J Biol Chem* 269 (3):2111-2117 ha riportato che REP1 e REP2 erano approssimativamente uguali nel facilitare l'attacco di gruppi GG a diverse proteine Rab, incluse Rab1A, Rab5A, e Rab6. I metodi esistenti per valutare REP1 usano Rab27a come substrato di prenilazione (Tolmachova, T. *et al.* (2012) *J. Gene Med.* 14: 158-168; Tolmachova, T. *et al.* (2013) *J. Mol. Med.* 91: 825-837; Vasireddy, V. *et al.*

(2013) PLoS ONE 8: e61396; e Black, A. et al. (2014) J. Gene Med. 16: 122-130). Ciò è probabilmente seguito da numerose implicazioni di Rab27a nella patogenesi della coroideremia. Ad esempio, è stato osservato che Rab27a è presente in forma non prenilata nelle cellule della coroideremia mentre altre Rab sono prenilate in modo adatto (Seabra, M.C. et al. (1995) J. Biol. Chem. 270: 24420-24427). Inoltre, Rab27a è espressa ad elevati livelli nell'epitelio pigmentato retinico e coriocalpillari, i due siti di iniziale degenerazione nella coroideremia.

Tuttavia, saggi che fanno affidamento sulla prenilazione di Rab27a generano segnali molto deboli. Come risultato, la sensibilità di questi saggi è bassa e possono non essere adatti per lo screening affidabile di vettori di terapia genica clinica. Di conseguenza, esiste una necessità significativa di saggi più affidabili e sensibili che possono essere usati per determinare l'attività di REP1 e testare i vettori di terapia genica.

SOMMARIO

La presente invenzione fornisce un metodo per determinare l'attività di un vettore di terapia genica codificante la proteina Rab escort 1 (REP1) per l'uso nel trattamento della coroideremia, oppure un metodo per l'analisi di controllo di qualità di un vettore di terapia genica codificante la proteina Rab escort 1 (REP1) per l'uso nel trattamento della coroideremia; il metodo comprendendo i passaggi di: (a) mettere a contatto un campione comprendente REP1 con Rab6a, Rab geranylgeraniltransferasi (Rab GGTasi) e un substrato donatore di lipidi, in cui il campione comprendente REP1 è di una cellula geneticamente ingegnerizzata per esprimere la REP1 usando il vettore di terapia genica codificante REP1; e (b) rivelare il prodotto Rab6a lipidato.

La presente invenzione fornisce anche l'uso di Rab6a per determinare in vitro l'attività di un vettore di terapia genica codificante la proteina Rab escort 1 (REP1) per l'uso nel trattamento della coroideremia, oppure l'uso di Rab6a per un'analisi di controllo di qualità in vitro di un vettore di terapia genica codificante la proteina Rab escort 1 (REP1) per l'uso nel trattamento della coroideremia; in cui Rab6a è messo a contatto con REP1 di una cellula geneticamente ingegnerizzata per esprimere la REP1 usando il vettore di terapia genica codificante REP1. Ulteriori aspetti e forme di realizzazione dell'invenzione sono esposti nelle rivendicazioni.

I presenti inventori hanno sorprendentemente riscontrato che, nonostante la conoscenza prevalente che Rab27a fornisca il substrato di saggio di prenilazione più adatto, l'uso di Rab6a come substrato in una reazione di

prenilazione fornisce un metodo più sensibile per determinare l'attività della proteina Rab escort 1 (REP1). Non solo Rab6a fornisce sensibilità aumentata in un saggio di rivelazione di prenilazione, esso fornisce anche rapporti segnale/rumore vantaggiosi, intervallo dinamico migliore del segnale e migliore coerenza.

Inoltre, gli inventori hanno dimostrato che la sensibilità aumentata di un saggio basato su Rab6a può essere sfruttato per determinare in modo preciso e affidabile l'attività di vettori codificanti REP1, in particolare vettori di terapia genica AAV, quali quelli adatti per l'uso nella clinica.

Di conseguenza, in un aspetto, la descrizione fornisce un metodo per determinare l'attività della proteina Rab escort 1 (REP1) comprendente i passaggi di:

- (a) fornire un campione comprendente REP1;
- (b) mettere a contatto il campione del passaggio (a) con Rab6a, Rab geranilgeraniltransferasi (Rab GGTasi) e un substrato donatore di lipidi; e
- (c) rivelare il prodotto Rab6a lipidato.

Ad esempio, il metodo della descrizione può essere per il test di vettori di terapia genica adatti per il rilascio di REP1 in una cellula target o per l'analisi di controllo di qualità di stock di vettori (ad es., stock di trattamento).

La validazione di vettori di terapia genica è obbligatoria per l'uso sicuro ed efficace della terapia genica nella clinica. Per i passaggi di analisi e di controllo di qualità, il confronto con esperimenti di controllo o livelli di riferimento può fornire una misura dell'attività del vettore di terapia genica o REP1 rispetto ad uno standard noto o accettato (ad es., migliore o peggiore rispetto ad uno standard noto o accettato). Questo può essere usato per convalidare se uno stock di vettori di terapia genica soddisfa i target e le regolazioni specifiche.

In un caso, il confronto è eseguito con un campione di REP1 o vettore AAV codificante REP1 che è definito come standard di riferimento primario. Il metodo della descrizione può essere, ad esempio, eseguito in parallelo su un campione di test e campione standard di riferimento primario. La potenza e/o il comportamento del campione di test può essere, ad esempio, definita rispetto allo standard di riferimento primario.

In altre parole, il metodo della descrizione può, ad esempio, essere usato per l'analisi di controllo di qualità e convalida di un vettore di terapia genica come efficace (ad es., per il trattamento della coroideremia),

preferibilmente una particella vettoriale AAV comprendente una sequenza nucleotidica codificante REP1, preferibilmente in cui un'attività o efficacia di produzione del vettore determinata mediante il metodo della descrizione al di sopra di una attività soglia o in un intervallo target specificato (ad es., mediante confronto con un esperimento di controllo o livello di riferimento) indica che il vettore è adatto per scopi di terapia genica.

Di conseguenza, in un altro aspetto, il metodo della descrizione è per l'analisi di controllo di qualità di un vettore di terapia genica codificante la proteina Rab escort 1 (REP1) (preferibilmente un vettore AAV).

In un altro aspetto, la descrizione fornisce un metodo per l'analisi di controllo di qualità di un vettore di terapia genica codificante la proteina Rab escort 1 (REP1) (preferibilmente un vettore AAV) comprendente i passaggi di:

- (a) trasdurre una cellula con il vettore, coltivare la cellula in condizioni adatte per l'espressione della REP1 e lisare le cellule per ottenere un campione comprendente REP1;
- (b) mettere a contatto il campione del passaggio (a) con Rab6a, Rab geranilgeraniltransferasi (Rab GGTasi) ed un substrato donatore di lipidi e
- (c) rilevare il prodotto Rab6a lipidato.

Di conseguenza, il metodo può comprendere l'esecuzione di una pluralità di esperimenti comprendente i passaggi da (a) a (c) in cui i parametri riguardanti il campione comprendente REP1 sono variati, mentre gli altri parametri (ad es., i parametri riguardanti Rab6a, Rab GGTasi e il substrato donatore di lipidi) sono mantenuti costanti. Tali parametri possono includere, ad esempio, la sequenza amminoacidica della proteina attinente (ad es., REP1), la sequenza nucleotidica codificante REP1 contenuta in un vettore usata per esprimere REP1 in una cellula, il tipo di vettore usato per rilasciare una sequenza nucleotidica codificante REP1 in una cellula (ad es., il tipo di vettore virale, quale il tipo di vettore virale adeno-associato (AAV), la concentrazione di REP1 e/o la molteplicità di infezione (MOI) di un vettore usato per rilasciare una sequenza nucleotidica codificante REP1 in una cellula. In un caso preferito, il metodo comprende l'esecuzione di una pluralità di esperimenti comprendenti i passaggi da (a) a (c) a differente MOI di un vettore usato per rilasciare una sequenza nucleotidica codificante REP1 in una cellula (ad es., per generare una curva dose-risposta).

In un caso, la rivelazione del prodotto Rab6a lipidato comprende la quantificazione della quantità del prodotto Rab6a lipidato. In un caso preferito, la rivelazione del prodotto Rab6a lipidato comprende la quantificazione della quantità del prodotto Rab6a lipidato rispetto al livello di controllo o di riferimento. La quantificazione può essere, ad esempio, eseguita rispetto ad un campione di REP1 o un vettore AAV codificante REP1 che è definito come standard di riferimento primario. Il metodo della descrizione può essere, ad esempio, eseguito in parallelo su un campione di test e sul campione standard di riferimento primario. La potenza e/o il comportamento del campione di test può essere, ad esempio, definita rispetto allo standard di riferimento primario.

In un caso, il metodo comprende un ulteriore passaggio per confrontare la quantità di prodotto Rab6a lipidato (ad es., prenilato, quale Rab6a geranilgeranilato o biotina geranilato) con una quantità determinata di un esperimento di controllo, quale un esperimento usando un campione noto o standard di REP1.

In un altro caso, il metodo comprende un ulteriore passaggio per confrontare la quantità di Rab6a lipidato (ad es., prenilato, quale Rab6a geranilgeranilato o biotina geranilato, con un livello di riferimento).

In un caso, il campione comprendente REP1 è di una cellula geneticamente ingegnerizzata per esprimere REP1. Preferibilmente il campione comprendente REP1 è un lisato di una cellula geneticamente ingegnerizzata per esprimere REP1. Preferibilmente, una cellula è trasfettata o trasdotta con un vettore comprendente una sequenza nucleotidica codificante REP1 per ottenere una cellula geneticamente ingegnerizzata per esprimere REP1. Preferibilmente il vettore è un vettore virale.

In un caso, la REP1 è espressa usando un vettore virale comprendente una sequenza nucleotidica codificante REP1.

In un caso, il vettore virale è un vettore virale adeno-associato (AAV). Preferibilmente, il vettore virale è sotto forma di una particella virale vettoriale.

Il vettore AAV può essere di qualsiasi sierotipo (ad es., comprende qualsiasi genoma e/o proteina capsidica di un sierotipo di AAV). Preferibilmente, il vettore è in grado di infettare o trasdurre le cellule dell'occhio.

In un caso, il vettore AAV comprende un genoma di AAV sierotipo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o 11. In un altro caso, il vettore AAV comprende un genoma di AAV sierotipo 2, 4, 5 o 8. Preferibilmente, il vettore AAV

comprende un genoma di AAV sierotipo 2.

In un caso, la particella vettoriale AAV comprende una proteina capsidica di AAV sierotipo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o 11. In un altro caso, la particella vettoriale AAV comprende una proteina capsidica di AAV sierotipo 2, 4, 5 o 8. La proteina capsidica di AAV sierotipo 8 può essere, ad esempio, una proteina capsidica mutante AAV8/Y733F. Preferibilmente la particella vettoriale AAV comprende una proteina capsidica di AAV sierotipo 2.

In un caso, la particella vettoriale AAV comprende un genoma di AAV2 e proteine capsidiche di AAV2 (AAV2/2); un genoma di AAV2 e proteine capsidiche di AAV5 (AAV2/5); o un genoma di AAV 2 e proteine capsidiche di AAV8 (AAV2/8). Preferibilmente, la particella vettoriale AAV comprende un genoma di AAV2 e proteine capsidiche di AAV2 (AAV2/2).

Una particella vettoriale AAV può essere un derivato chimerico, navetta o capside modificato di uno o più AAV naturali. In particolare, la particella vettoriale AAV può comprendere sequenze della proteina capsidica dei sierotipi, cladi, cloni o isolati differenti di AAV nello stesso vettore (ovvero un vettore pseudotipizzato). Pertanto, in un caso, il vettore AAV è sotto forma di una particella vettoriale AAV pseudotipizzata.

In un caso, la REP1 è REP1 umana.

In un caso, la REP1 comprende una sequenza amminoacidica che ha un'identità di almeno il 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% con SEQ ID NO: 5, preferibilmente in cui la sequenza amminoacidica mantiene sostanzialmente la funzione naturale della proteina rappresentata da SEQ ID NO: 5.

In un caso, la sequenza nucleotidica codificante REP1 comprende una sequenza nucleotidica che ha un'identità di almeno il 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% con SEQ ID NO: 6 o 7, preferibilmente in cui la proteina codificata dalla sequenza nucleotidica sostanzialmente mantiene la funzione naturale della proteina rappresentata da SEQ ID NO: 5.

In un caso, la sequenza nucleotidica codificante REP1 comprende una sequenza nucleotidica che comprende una sequenza amminoacidica che ha un'identità di almeno 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%,

97%, 98%, 99% o 100% con SEQ ID NO: 5, preferibilmente in cui la sequenza amminoacidica mantiene sostanzialmente la funzione naturale della proteina rappresentata da SEQ ID NO: 5.

In un caso, il Rab6a e/o Rab GGT sono sostanzialmente puri.

In un caso, Rab6a comprende una sequenza amminoacidica che un'identità di almeno il 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% con SEQ ID NO: 1, preferibilmente in cui la sequenza amminoacidica mantiene sostanzialmente la funzione naturale della proteina rappresentata da SEQ ID NO: 1.

In un caso, Rab GGTasi comprende una sequenza amminoacidica che ha un'identità di almeno 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% con SEQ ID NO: 3 o 8, preferibilmente SEQ ID NO: 8, preferibilmente in cui la sequenza amminoacidica mantiene sostanzialmente la funzione naturale della proteina rappresentata da SEQ ID NO: 8; e/o una sequenza amminoacidica che ha un'identità di almeno 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% con SEQ ID NO: 4 o 9, preferibilmente SEQ ID NO: 9, preferibilmente in cui la sequenza amminoacidica mantiene sostanzialmente la funzione naturale della proteina rappresentata da SEQ ID NO: 9.

In un altro caso, il rapporto molare Rab6a:Rab GGTasi è circa 1:0,25-3, 1:0,3-2,9, 1:0,35-2,8, 1:0,4-2,7, 1:0,45-2,6 o 1:0,5-2,5, preferibilmente circa 1:0,5-2,5.

In un caso, il rapporto molare Rab6a:Rab GGTasi è circa 1:2-3, 1:2,1-2,9, 1:2,2-2,8, 1:2,3-2,7 o 1:2,4-2,6, preferibilmente circa 1:2,4-2,6. In un caso, il rapporto molare Rab6a:Rab GGTasi è circa 1:2, 1:2,1, 1:2,2, 1:2,3, 1:2,4, 1:2,5, 1:2,6, 1:2,7, 1:2,8, 1:2,9 o 1:3, preferibilmente circa 1:2,5.

In un altro caso, il rapporto molare Rab6a:Rab GGTasi è circa 1:0,25-0,75, 1:0,3-0,7, 1:0,35-0,65, 1:0,4-0,6 o 1:0,45-0,55, preferibilmente circa 1:0,4-0,6. In un caso, il rapporto molare Rab6a:Rab GGTasi è circa 1:0,25, 1:0,3, 1:0,35, 1:0,4, 1:0,45, 1:0,5, 1:0,55, 1:0,6, 1:0,65, 1-0,7 o 1:0,75, preferibilmente circa 1:0,5.

In un caso, il substrato donatore di lipidi è geranylgeranylpirofosfato (GGPP), o un suo analogo. Preferibilmente, il substrato donatore di lipidi è marcato con un marcatore rilevabile. Ad esempio, il substrato donatore di lipidi può essere marcato isotopicamente (ad es., il substrato donatore di lipidi può comprendere ³H), o può

comprendere un gruppo fluorescente, epitopo o parte caratteristica biotina.

In un caso preferito, il substrato donatore di lipidi è biotina-geranilpirofosfato (BGPP).

In un caso, il prodotto Rab6a lipidato è rivelato usando un saggio immunoassorbente legato ad enzima (ELISA), analisi Western blot o autoradiografia. In un caso preferito, il prodotto Rab6a lipidato è rivelato usando un ELISA. L'ELISA può essere ad esempio, un ELISA sandwich.

In un caso preferito, il prodotto Rab6a lipidato marcato con biotina è rivelato usando un reagente di rivelazione specifico per la biotina, ad esempio streptavidina. Preferibilmente, il prodotto Rab6a lipidato marcato con biotina è rivelato usando analisi Western blot usando un reagente di rivelazione specifico per la biotina, ad esempio streptavidina (ad es., un coniugato streptavidina-perossidasi di rafano). In modo maggiormente preferibile, il prodotto Rab6a lipidato marcato con biotina è rivelato usando un ELISA con l'uso di un reagente di rivelazione specifico per la biotina, ad esempio streptavidina.

In un caso, il metodo è per la determinazione dell'attività di un vettore di terapia genica codificante REP1 per l'uso nel trattamento della coroideremia.

In un altro aspetto, la descrizione fornisce l'uso di Rab6a per determinare l'attività della proteina Rab escort 1 (REP1).

Il metodo per determinare l'attività di REP1, Rab6a, Rab GGTasi, substrato donatore di lipidi e REP1 può essere come descritto nella presente.

In un altro aspetto, la descrizione fornisce un metodo per determinare l'efficacia di un vettore comprendente una sequenza nucleotidica codificante la proteina Rab escort 1 (REP1), in cui il metodo comprende i passaggi di:

- (a) fornire un campione comprendente REP1, in cui REP1 è espressa usando il vettore comprendente una sequenza nucleotidica codificante REP1;
- (b) mettere a contatto il campione del passaggio (a) con Rab6a, Rab geranilgeraniltransferasi (Rab GGTasi) ed un substrato donatore di lipidi; e
- (c) rivelare il prodotto Rab6a lipidato.

In un altro aspetto, la descrizione fornisce l'uso di Rab6a per determinare l'efficacia di un vettore comprendente

una sequenza nucleotidica codificante la proteina Rab escort 1 (REP1).

Preferibilmente, il metodo e l'uso sono per determinare l'efficacia di un vettore per l'uso nel trattamento della coroideremia.

Il vettore REP1, Rab6a, Rab GGTasi, substrato donatore di lipidi, prodotto Rab6a lipidato, metodo di rivelazione ed altre caratteristiche del metodo e uso possono essere come descritto nella presente.

DESCRIZIONE DEI DISEGNI

Figura 1

Reazione di prenilazione in vitro usando Rab27a come substrato con successiva analisi Western blot (WB) del donatore lipidico biotinilato incorporato usando cellule non trasdotte e cellule trasdotte con AAV-GFP o AAV-REP1 (MOI = 10000 gp/cellula).

L'esperimento implica 3 gruppi di lisati preparati indipendentemente. Le reazioni di prenilazione sono state preparate usando 10 µg di lisato in un volume totale di 12,5 µl. I controlli positivi sono stati arricchiti con 2 µM di REP1 di pesce. Il tempo di rivelazione era 2 minuti.

(A) Analisi WB dei livelli di REP1 umana in lisati cellulari (1:1000). Cellule non trasdotte (N. 4, N. 9 ed N. 12) presentano livelli endogeni di REP1. Le cellule trasdotte con AAV-GFP (N. 5, N. 10 e N. 13) presentano livelli endogeni di REP1 simili alle cellule non trasdotte. Le cellule trasdotte con AAV-REP1 (N. 6, N. 11 e N. 14) presentano un aumento di livelli di REP1 rispetto alle cellule non trasdotte e trasdotte con AAV-GFP. I controlli positivi (+ve) presentano livelli di REP1 endogeni.

(B) Analisi WB di β-actina come controllo di carico (1:15000). I livelli di β-actina sono simili in tutti i campioni analizzati.

(C) Analisi WB del donatore di lipidi biotinilato incorporato in Rab27a (1:10000). Le cellule non trasdotte e le cellule trasdotte con AAV-GFP presentano l'incorporazione non rivelabile di biotina in Rab27a. Le cellule trasdotte con AAV-REP1 presentano un certo livello di biotina incorporata in Rab27a (N. 6, N. 11 e N. 14). I controlli positivi presentano la più forte banda tra tutti come risultato dell'attività di REP1 di pesce.

(D) Semiquantificazione dell'analisi WB in (C) usando il software Image Studio Lite software.

Figura 2

Reazione di prenilazione in vitro usando Rab27a come substrato successiva analisi Western blot (WB) del donatore di lipidi biotinilato incorporato usando cellule non trasdotte e cellule trasdotte con AAV-GFP o AAV-REP1 (MOI = 10000 gp/cellule).

L'esperimento implica 2 gruppi di lisati preparati indipendentemente. Le reazioni di prenilazione sono state preparate usando 30 µg di lisato in un volume totale di 22 µl. I controlli positivi sono stati arricchiti con 1 µM di REP1 di pesce. Il tempo di rivelazione era 2 min.

(A) Analisi WB di livelli di REP1 umana in lisati cellulari (1:1000). Cellule non trasdotte (N. 9 e N. 12) presentano livelli endogeni di REP1. Le cellule trasdotte con AAV-GFP (N.10 e N.13) presentano livelli endogeni di REP1 simili alle cellule non trasdotte. Le cellule trasdotte con AAV-REP1 (N.11 e N.14) presentano un aumento di livelli di REP1 rispetto alle cellule non trasdotte e trasdotte con AAV-GFP. I controlli positivi (+ve) presentano livelli di REP1 endogeni.

(B) Analisi WB di β-actina come controllo di carico (1:15000). I livelli di β-actina sono simili in tutti i campioni analizzati.

(C) Analisi WB del donatore di lipidi biotinilato incorporato in Rab27a (1:10000). Cellule non trasdotte e cellule trasdotte con AAV-GFP non presentano incorporazione rilevabile di biotina in Rab27a. Le cellule trasdotte con AAV-REP1 presentano un certo livello di biotina incorporata in Rab27a (N.11 e N.14). I controlli positivi presentano la più forte banda tra tutti come risultato dell'attività di REP1 di pesce.

(D) Semiquantificazione dell'analisi WB in (C) usando il software Image Studio Lite.

Figura 3

Reazione di prenilazione in vitro usando Rab6a come substrato con successiva analisi Western blot (WB) di donatore lipidico biotinilato incorporato usando cellule non trasdotte e cellule trasdotte con AAV-GFP o AAV-REP1 (MOI = 10000 gp/cellule).

L'esperimento implica 2 gruppi di lisati preparati indipendentemente. Le reazioni di prenilazione sono state preparate usando 20 µg di lisato in un volume totale di 20 µl. I controlli positivi sono stati arricchiti con 1 µM di

REP1 di pesce. Il tempo di rivelazione era 2 min.

(A) Analisi WB dei livelli di REP1 umana in lisati cellulari (1:1000). Cellule non trasdotte (N.9 e N.12) presentano livelli endogeni di REP1. Cellule trasdotte con AAV-GFP (N.10 e N.13) presentano livelli endogeni di REP1 simili alle cellule non trasdotte. Le cellule trasdotte con AAV-REP1 (N.11 e N.14) presentano un aumento dei livelli di REP1 rispetto alle cellule non trasdotte e trasdotte con AAV-GFP. Controlli positivi (+ve) presentano livelli di REP1 endogeni.

(B) Analisi WB della β -actina come controllo di carico (1:15000). I livelli di β -actina sono simili in tutti i campioni analizzati.

(C) Analisi WB del donatore di lipidi biotinilato incorporato in Rab6a (1:10000). Cellule non trasdotte e cellule trasdotte con AAV-GFP presentano incorporazione molto bassa di biotina in Rab6a. Le cellule trasdotte con AAV-REP1 presentano incorporazione di biotina in Rab6a (N.11 e N.14). I controlli positivi presentano la più forte banda tra tutte come risultato dell'attività di REP1 di pesce.

(D) Semiquantificazione dell'analisi WB in (C) usando il software Image Studio Lite.

Figura 4

Reazione di prenilazione in vitro usando Rab6a come substrato con successiva analisi Western blot (WB) del donatore di lipidi biotinilato incorporato usando cellule non trasdotte e cellule trasdotte con AAV-REP1 (MOI = 250, 1000, 5000, 10000 e 20000 gp/cellule).

Le reazioni di prenilazione sono state preparate usando 20 μ g di lisato in un volume totale di 15 μ l. Il controllo positivo è stato arricchito con 0,5 μ M di REP1 di pesce. Il tempo di rivelazione era 2 min.

(A) Analisi WB dei livelli di REP1 umana in lisati cellulari (1:2500). Cellule non trasdotte presentano livelli endogeni di REP1. Cellule trasdotte con AAV-REP1 presentano un aumento di livelli di REP1 che si correla direttamente con la MOI usata. Il controllo positivo (+ve) presenta livelli di REP1 endogeni.

(B) Analisi WB di β -actina come controllo di carico (1:50000). I livelli di β -actina sono simili in tutti i campioni analizzati.

(C) Analisi WB di donatore di lipidi biotinilati incorporato in Rab6a (1:10000). Cellule non trasdotte presentano

livelli molto bassi di incorporazione di biotina in Rab6a. Le cellule trasdotte con AAV-REP1 presentano sempre più biotina incorporata in Rab6a. Il controllo positivo presenta la più forte banda tra tutti come risultato dell'attività di REP1 di pesce.

(D) Semiquantificazione dell'analisi WB in (C) usando il software Image Studio Lite.

Figura 5

Reazione di prenilazione in vitro usando Rab6a come substrato con successiva analisi Western blot (WB) del donatore di lipidi biotinilato incorporato usando cellule non trasdotte e cellule trasdotte con AAV-REP1 (MOI = 10000 gp/cellule).

Le reazioni di prenilazione sono state impostate usando 20 µg di lisato in un volume totale di 15 µl. Il controllo positivo è stato arricchito con 0,5 µM di REP1 di pesce. Il tempo di rivelazione era 2 min per REP1/actina e 30 secondi per biotina.

(A) Analisi WB dei livelli di REP1 umana in lisati cellulari (1:2500). Le cellule non trasdotte presentano livello endogeno di REP1. Le cellule trasdotte con AAV-REP1 presentano un aumento dei livelli di REP1. Il controllo positivo (+ve) presenta livelli di REP1 endogeni.

(B) Analisi WB di β-actina come controllo di carico (1:50000). I livelli di β-actina sono simili in tutti i campioni analizzati.

(C) Analisi WB di donatore di lipidi biotinilato incorporato in Rab6a (1:10000). Le cellule non trasdotte presentano un'incorporazione di biotina molto bassa in Rab6a. Le cellule trasdotte con AAV-REP1 presentano incorporazione di biotina aumentata in Rab6a. Il controllo positivo presenta la più forte banda tra tutti come risultato dell'attività di REP1 di pesce.

(D) Semiquantificazione dell'analisi WB in (C) usando il software Image Studio Lite.

Figura 6

Reazione di prenilazione in vitro, con successiva analisi Western blot (WB) di donatore di lipidi biotinilato incorporato in cellule ARPE-19 non trasdotte, e cellule ARPE-19 trasdotte con AAV-REP1.

Le reazioni di prenilazione sono state impostate usando 15 µg di lisato in un volume totale di 45 µl. Il controllo

positivo è stato arricchito con 0,1 μ M di REP1 di pesce. Il tempo di rivelazione per REP1/actina: 2 min; per biotina: 30 secondi.

Gli esperimenti sono stati eseguiti in parallelo usando le seguenti cellule:

(a) Cellule non trasdotte (N.86 e N.87); e

(b) Cellule + AAV-REP1 MOI 10.000 (N.90 e N.91) – vettore di qualità R&D.

(A) Analisi WB dei livelli di REP1 umana in lisati cellulari (1:2.500). Le cellule non trasdotte presentano livello endogeno di REP1. Le cellule trasdotte con AAV-REP1 presentano un aumento dei livelli di REP1. Il controllo positivo (+ve) presenta livelli di REP1 endogeni.

(B) Analisi WB di β -actina come controllo di carico (1:50.000). I livelli di β actina sono simili in tutti i campioni analizzati..

(C) Analisi WB di donatore di lipidi biotinilato incorporato in Rab6a (1:10.000). Le cellule non trasdotte presentano una incorporazione molto bassa di biotina in Rab6a; le cellule trasdotte con AAV-REP1 presentano un'incorporazione di biotina aumentata in Rab6a. Il controllo positivo presenta la più forte banda tra tutte, come risultato dell'attività di REP1 di pesce.

(D) Semiquantificazione dell'analisi WB in (C) usando il software Image Studio Lite.

Figura 7

Reazione di prenilazione in vitro, con successiva analisi Western blot (WB) del donatore di lipidi biotinilato incorporato in cellule HT1080 non trasdotte, e cellule HT1080 trasdotte con AAV-REP1.

Le reazioni di prenilazione sono state preparate usando 20 μ g di lisato in un volume totale di 20 μ l. Il controllo positivo è stato arricchito con 0,1 μ M di REP1 di pesce. Il tempo di rivelazione per REP1/actina: 2 min; per biotina: 30 secondi.

Gli esperimenti sono stati eseguiti in parallelo usando le seguenti cellule:

(a) Cellule non trasdotte (N.56 e N.57);

(b) Cellule + AAV-REP1 MOI 10.000 (N.60 e N.61) – vettore qualità R&D; e

(c) Cellule + AAV-REP1 MOI 10.000 (N.64 e N.65) – vettore di qualità clinica.

(A) Analisi WB di livelli di REP1 umana in lisati cellulari (1:2.500). Cellule non trasdotte presentano livelli endogeni di REP1. Le cellule trasdotte con AAV-REP1 presentano un aumento di livelli di REP1. Il controllo positivo (+ve) presentano livelli di REP1 endogeni.

(B) Analisi WB della β -actina come controllo di carico (1:50.000). I livelli di β -actina sono simili in tutti i campioni analizzati.

(C) Analisi WB di donatore di lipidi biotinilato incorporato in Rab6a (1:10.000). Le cellule non trasdotte presentano livelli basali di incorporazione di biotina in Rab6a; le cellule trasdotte con AAV-REP1 presentano l'incorporazione di biotina aumentata in Rab6a.

(D) Semiquantificazione dell'analisi WB in (C) usando il software Image Studio Lite.

Figura 8

Reazione di prenilazione in vitro, con successiva analisi Western blot (WB) di donatore di lipidi biotinilato incorporato in cellule non trasdotte, e cellule trasdotte con AAV-REP1 (MOI = 250, 1000, 5000, 10000 e 20000 gp/cellule) confrontando i substrati Rab6a e Rab27a.

Le reazioni di prenilazione sono state impostate usando 20 μ g di lisato in un volume totale di 15 μ l, e 2 substrati differenti: Rab27a (lane e grafici a sinistra, in rosso) e Rab6a (lane e grafici a destra, in blu). I controlli positivi, uno per ciascun substrato sono stati arricchiti con 0,1 μ m di REP1 di pesce. Tempo di rivelazione: 2 min.

(A) Analisi WB dei livelli di REP1 umana in lisati cellulari (1:2.500). Le cellule non trasdotte presentano livello endogeno di REP1. Le cellule trasdotte con AAV-REP1 presentano un aumento dei livelli di REP1 che si correla direttamente con la MOI usata. Il controllo positivo (+ve) presenta livelli di REP1 endogeni.

(B) Analisi WB di β -actina come controllo di carico (1:50.000). I livelli di β -actina sono simili in tutti i campioni analizzati.

(C) Analisi WB di donatore di lipidi biotinilato incorporato in Rab27a e Rab6a. Cellule non trasdotte presentano un'incorporazione molto bassa di biotina nella proteina Rab, che aumenta mano mano che la MOI aumenta. I controlli positivi mostrano una forte incorporazione di biotina, come risultato dell'attività di REP1 di pesce.

(D) Semiquantificazione dell'analisi WB in (C) usando il software Image Studio Lite. I dati sono stati tracciati

usando il software Prism mostrato nei quattro grafici in (E).

(E) I valori di densità di banda dei substrati biotinilati in tutte le MOI usate (due grafici superiori) e rapporto tra substrati biotinilati e REP1 con l'uso di MOI (due grafici inferiori).

Figura 9

Reazione di prenilazione in vitro, con successiva analisi Western blot (WB) di donatore di lipidi biotinilato incorporato nelle cellule non trasdotte confrontando condizioni di reazione di prenilazione differenti.

Le reazioni di prenilazione sono state preparate usando 20 µg di lisato in un volume totale di 15 µl e 2 substrati differenti: Rab27a (in rosso) e Rab6a (in blu). I controlli positivi, uno per ciascun substrato, sono stati arricchiti con REP1 umana ricombinante. Tempo di rivelazione: 2 min.

(A) Analisi WB di donatore di lipidi biotinilato incorporato in Rab27a e Rab6a. Il livello di incorporazione di biotina è direttamente proporzionale alla quantità di proteina totale nella reazione. I controlli positivi presentano una forte incorporazione di biotina come risultato dell'attività di REP1 di pesce..

(B) Analisi WB di β-actina come controllo di carico (1:50.000). I livelli di β-actina corrispondono alla quantità di lisati di cellule totali usate nella reazione e sono simili tra i campioni.

(C) Analisi WB dei livelli di REP1 umana in lisati cellulari (1:2.500). Le cellule non trasdotte presentano il livello endogeno di REP1. Il controllo positivo (+ve) presenta la più elevata densità di REP1.

(D) Semiquantificazione dell'analisi WB in (A) usando il software Image Studio Lite. I dati sono stati tracciati usando il software Prism. I valori evidenziati sono per le condizioni in cui è stata rivelata una maggiore differenza tra i substrati.

Figura 10

Confronto tra Rab27a e Rab6a come substrati per la prenilazione in cellule trasdotte con AAV-REP1.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA

Diverse caratteristiche e casi preferiti della presente descrizione saranno ora descritti a titolo di esempi non limitativi.

La pratica della presente descrizione userà, se non diversamente indicato, tecniche convenzionali di chimica,

biochimica, biologia molecolare, microbiologia e immunologia, che rientrano nelle capacità di un comune esperto nella tecnica. Tali tecniche sono spiegate nella letteratura. Si vedano, ad esempio, Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2^a Edizione, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F.M. et al. (1995 e supplementi periodici) *Current Protocols in Molecular Biology*, Ch. 9, 13 and 16, John Wiley & Sons; Roe, B., Crabtree, J. and Kahn, A. (1996) *DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques*, John Wiley & Sons; Polak, J.M. and McGee, J.O'D. (1990) *In Situ Hybridization: Principles and Practice*, Oxford University Press; Gait, M.J. (1984) *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press; and Lilley, D.M. and Dahlberg, J.E. (1992) *Methods in Enzymology: DNA Structures Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA*, Academic Press.

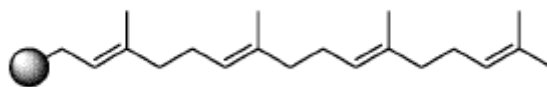
Prenilazione

Lipidazione di proteine mediante addizione di parti caratteristiche isoprenoidi è una modificazione post-trasduzionale che interessa fino al 2% del proteoma di mammifero. Tale lipidazione consente l'associazione reversibile delle proteine target con le membrane cellulari e può anche modulare le interazioni proteina-proteina. Preferibilmente, la lipidazione citata nella presente è la prenilazione, in modo che il substrato donatore di lipidi e il prodotto Rab6a lipidato siano un substrato donatore di gruppo prenil e il prodotto Rab6a prenilato, rispettivamente.

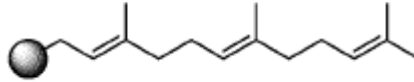
La prenilazione è un tipo specifico di modificazione post-trasduzionale in cui una parte caratteristica geranilgeranile o farnesile (o analogo di ognuno) è attaccata ad uno o due residui cisteina C-terminale di una proteina attraverso un legame tioetere.

Preferibilmente, la prenilazione è l'addizione di una parte caratteristica geranilgeranile o un suo analogo (ad es., parte caratteristica biotina-geranile) ad una proteina target (ad es., Rab6a).

Una parte caratteristica geranilgeranile attaccata ad una proteina (la proteina è rappresentata schematicamente dal cerchio ombreggiato) è:

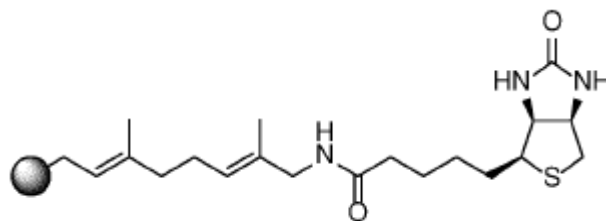


Una parte caratteristica farnesile attaccata ad una proteina (la proteina è rappresentata schematicamente dal cerchio ombreggiato) è:



Il termine "analogo" è usato nella presente in relazione alla parte lipidica (ad es., geranylgeranile o farnesile) o il substrato donatore di lipidi per indicare un composto che è stato modificato per comprendere un gruppo funzionale adatto per un particolare scopo, quale la rivelazione. L'analogo può essere addizionato ad una proteina substrato mediante il sistema di prenilazione (ovvero REP1 e Rab GGTasi) in un modo sostanzialmente non impedito (per gli scopi dei saggi di attività della descrizione) mediante la modificazione.

Di conseguenza, gli analoghi delle parti caratteristiche di cui sopra includono quelli che sono stati creati in modo artificiale per particolari scopi (ad es., parti caratteristiche marcate che sono adatte per la rivelazione in un saggio). In particolare, Nguyen et al. (Nguyen, U.T. et al. (2009) Nat. Chem. Biol. 5: 227-235) hanno sviluppato la seguente parte caratteristica biotina-geranile che può essere rivelata in reazioni di prenilazione proteica in vitro (la parte caratteristica biotina-geranile è mostrata attaccata ad una proteina, che è rappresentata schematicamente dal cerchio ombreggiato):



Rab6a

Rab6a (Rab-6A proteina Ras-affine) è un membro della famiglia di Rab GTPasi di mammifero che è di per sé la più grande alla super-famiglia Ras-simile di GTPasi.

Rab GTPasi (anche note come proteine Rab) sono proteine di membrana periferica e sono coinvolte nella regolazione del traffico di membrana, incluse la formazione di vescicole, lo spostamento della vescicola lungo i reticoli di actina e tubulina, e la fusione di membrana. La funzione principale di Rab6a è conosciuta come la

regolazione del trasporto proteico dal complesso del Golgi nel reticolo endoplasmatico.

Rab GTPasi sono tipicamente ancorate ad una membrana cellulare attraverso gruppi prenili (in particolare gruppi geranilgeranile) che sono legati in modo covalente a due residui cisteina C-terminali.

Rab GTPasi presentano due conformazioni: una forma legata a GDP inattiva; ed una forma legata a GTP attiva.

La conversione dalle forme legate a GDP alle forme legate a GTP è catalizzata da un fattore di scambio (GEF) GDP/GTP, che attiva così l'Rab GTPasi. Al contrario, l'idrolisi di GTP da parte delle Rab GTPasi può essere potenziata mediante una proteina attivante la GTPasi (GAP), che porta così all'inattivazione di Rab.

In un caso, Rab6a è Rab6a umana.

Una sequenza amminoacidica esemplificativa di Rab6a è la sequenza depositata con il numero di Accesso NCBI N. NP_942599.1

Una sequenza amminoacidica esemplificativa di Rab6a è:

```
MSTGGDFGNPLRKFKLVLFLGEQSVGKTSLITRFMYDSFDNTYQATIGIDFLSKTMYLEDRTVRLQLWDTAGQ  
ERFRSLIPSYIRDSTVAVVVYDITNVNSFQQTTKWIDDVTRTERGSDVIIMLVGNKTDLADKRQVSIIEGERK  
AKELNVMFIETSAKAGYNVKQLFRRVAAALPGMESTQDRSREDMIDIKLEKQPQPVSEGGCSC
```

(SEQ ID NO: 1)

Una sequenza nucleotidica esemplificativa codificante Rab6a è la sequenza depositata con il numero di Accesso NCBI N. NM_198896.1

Una sequenza nucleotidica esemplificativa codificante Rab6a è:

```
ATGTCCACGGGCGGAGACTTCGGGAATCCGCTGAGGAAATTCAGCTGGTGTTCCTGGGGGAGCAAAGCGTT  
GGAAAGACATCTTTGATCACCAGATTCATGTATGACAGTTTTGACAACACCTATCAGGCAACAATTGGCATT  
GACTTTTTATCAAAAATATGTACTTGGAGGATCGAACAGTACGATTGCAATTATGGGACACAGCAGGTCAA  
GAGCGGTTTCAGGAGCTTGATTCCTAGCTACATTCGTGACTCCACTGTGGCAGTTGTGTTTATGATATCACA  
AATGTTAACTCATTCCAGCAAACACTACAAAGTGGATTGATGATGTCAGAACAGAAAGAGGAAGTATGTTATC  
ATCATGCTAGTAGGAAATAAAAACAGATCTTGCTGACAAGAGGCAAGTGTCAATTGAGGAGGGAGAGAGGAAA  
GCCAAAGAGCTGAATGTTATGTTTATTGAAACTAGTGCAAAAGCTGGATAACAATGTAAGCAGCTCTTTTGA  
CGTGTAGCAGCAGCTTTGCCGGGAATGGAAAGCACACAGGACAGAAAGCAGAGAAGATATGATTGACATAAAA  
CTGAAAAGCCTCAGGAGCAACCAGTCAAGTGAAGGAGGCTGTTCTGCTAA
```

(SEQ ID NO: 2)

Rab geranilgeraniltransferasi (Rab GGTasi)

Rab geranilgeraniltransferasi (Rab GGTasi; anche nota come geranilgeraniltransferasi II) è una proteina preniltransferasi che prenila esclusivamente le GTPasi della famiglia Rab.

Rab GGTasi tipicamente catalizza naturalmente il trasferimento di due gruppi geranilgeranile nei residui cisteina al C-terminale delle Rab GTPasi. Ciascun gruppo geranilgeranile è coniugato alla Rab GTPasi attraverso un

legame tioetere in un residuo cisteina.

E' stato dimostrato che la Rab GGTasi è in grado di legarsi ad una gamma di fosfoisoprenoidi derivatizzati e può catalizzare la loro addizione nei substrati della Rab GTPasi (ad es., Rab6a). Ad esempio, Nguyen et al. (Nguyen, U.T. et al. (2009) Nat. Chem. Biol. 5: 227-235) hanno dimostrato l'addizione riuscita di una parte caratteristica biotina-geranile alle Rab GTPasi.

Rab GGTasi è un enzima eterodimerico costituito da subunità alfa e beta.

In un caso, la Rab GGTasi è Rab GGTasi umana. In un caso preferito, la Rab GGTasi è Rab GGTasi di ratto.

Sequenze amminoacidiche esemplificative delle subunità alfa della Rab GGTasi sono le sequenze depositate con il N. di Accesso NCBI NP_004572.3 e NP_113842.1.

Le sequenze amminoacidiche esemplificative di Rab GGTasi subunità alfa sono:

```
MHGRLKVKTSEEQAEAKRLEREQKCLKLYQSATQAVFQKRQAGELDESIVLELTSQILGANPDFATLWNCRREV
LQOLETQKSPEELAAALVKAELGFLSCLRVNPKSYGTWHHRCWLLGRLEPNWNTRELELCARFLEVDERNFH
CWDYRRFVATQAAVPPAEELAFDLSLITRNFSNYSWYHRSCLLPQLHPQDPSGPGQRLPEDVLLKELELVQ
NAFFTDPNQSAWFYHRWLLGRADPQDALRCLHVSDEACTVFSRPLLVGSRMEILLMVDDSPDIVWEWR
TPDGRNRPSHVWLCDLPAASLNDQLPQHTFRVIWTAGDVQKECVLLKGRQEGWCRDSTTDEQLFRCELSVEK
STVLQSELESCKELQELEPENKWCLLTIILLMRALDPLLYEKETLQYFQTLKAVDPMRATYLDLRSKFLLE
NSVLKMEYAEVRVHLHAHKDLTVLCHLEQLLLVTHLDLSHNRLRTPPALAALRCLEVLQASDNAIESLDGV
TNLPRLQELLLCNRLQQPAVLQPLASCPRLVLLNLQGNPLCQAVGILEQLAELLPVSSVLT
```

(SEQ ID NO: 3)

```
MHGRLKVKTSEEQAEAKRLEREQKCLKLYQSATQAVFQKRQAGELDESIVLELTSQILGANPDFATLWNCRREV
LQHLETEKSPPEESAALVKAELGFLSCLRVNPKSYGTWHHRCWLLSRLPEPNWARELELCARFLEADERNFH
CWDYRRFVAQAQAVAPAEELAFDLSLITRNFSNYSWYHRSCLLPQLHPQDPSGPGQRLPENVLLKELELVQ
NAFFTDPNQSAWFYHRWLLGRAEPHDVLCVHVSREEACLSVCFSRPLTVGSRMGTLMLMVDEAPLSVEWR
TPDGRNRPSHVWLCDLPAASLNDQLPQHTFRVIWTGSDSQKECVLLKDRPECWCRD SATDEQLFRCELSVEK
STVLQSELESCKELQELEPENKWCLLTIILLMRALDPLLYEKETLQYFSTLKAVDPMRAAYLDLRSKFLLE
NSVLKMEYADVRVHLHAHKDLTVLCHLEQLLLVTHLDLSHNRLRALPPALAAALRCLEVLQASDNALENVDGV
ANLPRLQELLLCNRLQQAIAIQPLVSCPRLVLLNLQGNLSCQEEGIQERLAEMLPVSSILT
```

(SEQ ID NO: 8)

Sequenze amminoacidiche esemplificative delle subunità beta della Rab GGTasi sono le sequenze depositate con

N. di Accesso NCBI NP_004573.2 e NP_619715.1.

Sequenze amminoacidiche esemplificative delle subunità beta della Rab GGTasi sono:

```
MGTPQKDVIIKSDAPDILLLEKHADYIASYSGSKDDYECMSEYLRMSGIYWGLTVMDLMGQLHRMNREEILL
AFIKSCQHECGGISASIGHDPHLLYTLASVQIILTLYDSINVIDVNKVVVEYVKGKQKEDGSGFAGDIWGEIDTR
FSFCAVATLALLGKLDAINVEKAIIEFVLSMNFDDGGFCRPGSESHAGQIYCCTGFLAITSQLHQVNSDLLG
WWLCERQLPSSGGLNGRPEKLPDVCYSWWVLAASKIIGRLHWIDREKLRNFIACQDEETGGFADRPDGMVDP
FHTLFGIAGLSLLGEEQIKPVNPFVFCMPPEEVLQRVNVVQPELVS
```

(SEQ ID NO: 4)

e

```
MGTQQKDVTIKSDAPDTLLEKHADYIASYGSKKDDYECMSEYLRMSGVYWGTLVMDLMGQLHRMNKEEIL
VFIKSCQHECGGVSASIGHDPHLLYTLQILTYDSIHVINVDKVVAYVQSLQKEDGSFAGDIWGEIDTR
FSFCAVATLALLGKLDAINVEKAIEFVLSMNFDDGGFCRPGSESHAGQIYCCTGFLAITSQLHQVNSDLLG
WWLCERQLPSGGLNGRPEKLPDVCYSWWVLAASKIIGRLHWIDREKLRSFILACQDEETGGFADRPDMVDP
FHTLFGIAGLSLLGEEQIKPVSPVFCMPEEVLQRVNVQPELVS
```

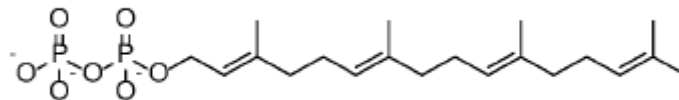
(SEQ ID NO: 9)

Substrato donatore di lipidi

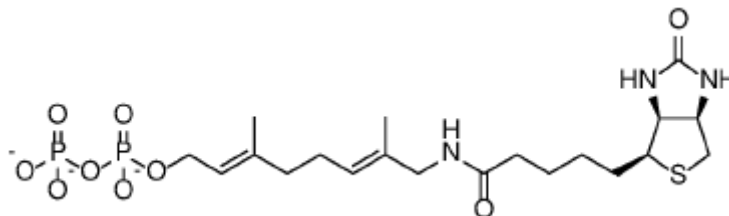
Per aggiungere una parte caratteristica lipidica ad una Rab GTPasi, la Rab GGTasi può usare la parte caratteristica lipidica sotto forma di un substrato donatore di lipidi (ad es.,geranilgeranile o biotina-geranile) come substrato. Questi sono derivati tipicamente pirofosfato della parte caratteristica lipidica.

Ad esempio, geranilgeranilpirofosfato (GGPP) o biotina-geranilpirofosfato (BGPP) possono essere usati come substrati donatori di lipidi da parte della Rab GGTasi per trasferire una parte caratteristica geranilgeranile o biotina-geranile, rispettivamente, al substrato Rab GTPasi.

Geranilgeranilpirofosfato ha la struttura:



Una struttura esemplificativa di biotina-geranilpirofosfato è:



Proteina Rab escort 1 (REP1)

Le proteine Rab escort (REP) svolgono le funzioni di presentare le Rab GTPasi non prenilate alle Rab GGTasi, e di trasportare le Rab GTPasi prenilate nelle loro membrane target.

Le Rab GTPasi non comprendono una sequenza di consenso nel sito di prenilazione che può essere riconosciuto dalle Rab GGTasi. Tuttavia, il riconoscimento del substrato è realizzato attraverso le REP che si legano alle Rab GTPasi attraverso una regione conservata e quindi presentano la Rab GGTasi con il suo substrato per la

prenilazione.

Una volta prenilate, le ancore lipidiche rendono le Rab GTPasi insolubili. Di conseguenza, le REP sono necessarie per legare e solubilizzare i gruppi geranilgeranile e contribuiscono al rilascio della Rab GTPasi nella membrana cellulare target.

REP1 può anche essere noto come Rab proteina geranilgeraniltransferasi componente A. Inoltre, il gene che codifica REP1 può essere noto come CHM.

In un caso, la REP 1 è REP1 umana.

Una sequenza amminoacidica esemplificativa di REP1 è:

```
MADTLPSEFDVIVIGTGLPESI IAAACSRSGRRVLHVDSRSYGGNWFASFSGLLSWLKEYQENS DIVSDS
PVWQDQILENEEAIALSRKDKTIQHVEVFCYASQDLHEDVEEAGALQKNHALVTSANSTEAADSAFLPTEDE
SLSTMSCEMLTEQTPSSDPENALEVNGAEVTGEKENHCDDKTCVPSTSAEDMSENVPIAEDTTEQPKNRIIT
YSQIIKEGRRFNIDLVSKLLYSRGLLIDLLIKSNVSRYAEFKNIIRILAFREGRVEQVPCSRADVFNSKQLT
MVEKRMLMKFLTFCMEYKYPDEYKGYEEITFYEYLKTKQLTPNLQYIVMHSIAMTSETASSTIDGLKATKN
FLHCLGRYGNTPFLFPLYGQGELPQCFCRMCAVFGGIYCLRHSVQCLVVDKESRKCKAIIIDQFGQRIISEHF
LVEDSYFPENMCSRVRQYRQISRAVLIIDRSVLKTDSDQQISILVPAEPEGTFAVRVIELCSSTMTCKMGTY
LVHLCTSSKTAREDES SVVQRLFVPYTEMIE NEQVEKPRI LWALYFNMRDSSDI SRSCYNDLP SNVYVCS
GPDCCGLGNDNAVKQAETLQEI CPNEDFCPPPPNPEDI ILDGD SLQPEASESAIPEANSETFKESTNLGNL
EESSE
```

(SEQ ID NO: 5)

Una sequenza nucleotidica esemplificativa codificante REP1 è:

```
ATGGCGGATACTCTCCCTCGGAGTTTGATGTGATCGTAATAGGGACGGGTTTGCCTGAATCCATCATTGCA
GCTGCATGTTCAAGAAGTGGCCGGAGAGTTCTGCATGTTGATTCAAGAAGCTACTATGGAGGAAACTGGGCC
AGTTTTAGCTTTTTCAGGACTATTGCTCCTGGCTAAAGGAATACCAGGAAAACAGTGACATTGTAAGTGACAGT
CCAGTGTGGCAAGACCAGATCCTTGAAAATGAAGAAGCCATTGCTCTTAGCAGGAAGGACAAAACTATTCAA
CATGTGGAAGTATTTTGTATGCCAGTCAGGATTTGCATGAAGATGTCGAAGAAGCTGGTGCCTGCAGAAA
AATCATGCTCTTGTGACATCTGCAAACTCCACAGAAGCTGCAGATTCTGCCCTCCTGCCTACGGAGGATGAG
TCATTAAGCACTATGAGCTGTGAAATGCTCACAGAACAACTCCAAGCAGCGATCCAGAGAATGCGCTAGAA
GTAATGGTGCTGAAGTGACAGGGGAAAAAGAAAAACCATTTGTGATGATAAACTTGTGTGCCATCAACTCA
GCAGAAGACATGAGTGAATGTGCCATAGCAGAAGATACCACAGAGCAACCAAGAAAAACAGAATTACT
TACTCACAAATTAATAAGAAGGCAGGAGATTAATATTGATTTAGTATCAAAGCTGCTGTATTCTCGAGGA
TTACTAATTGATCTTCTAATCAATCTAATGTTAGTCGATATGCAGAGTTTAAAAATATTACCAGGATTCCTT
GCATTCGAGAAGGACGAGTGGAAACAGGTTCCGTGTTCCAGAGCAGATGCTTTAATAGCAAACAATTACT
ATGGTAGAAAAGCGAATGCTAATGAAATTTCTTACATTTTGTATGGAATATGAGAAATATCCTGATGAATAT
AAAGGATATGAAGATCACATTTTATGAATATTTAAAGACTCAAAAATTAACCCCAACCTCCAATATATT
GTCATGCATTCAATTGCAATGACATCAGAGACAGCCAGCAGCACCATAGATGGTCTCAAAGCTACCAAAAAAC
```

```
TTTCTTCACTGTCTTGGGCGGTATGGCAACACTCCATTTTGTTCCTTTATATGGCCAAGGAGAAGTCCCC  
CAGTGTCTTTCGACAGGATGTGTGCTGTGTTGGTGGAAATTTATTGTCTTCGCCATTACAGTACAGTGCCTTGTA  
GTGGACAAAGAATCCAGAAAATGTAAGCAATATAGATCAGTTTGGTCAGAGAATAATCTCTGAGCATTTC  
CTCGTGGAGGACAGTTACTTTCCTGAGAACATGTGCTCACGTGTGCAATACAGGCAGATCTCCAGGGCAGTG  
CTGATTACAGATAGATCTGTCCAAAAACAGATTCAGATCAACAGATTTCCATTTTGACAGTGCAGCAGAG  
GAACCAGGAACTTTGTGCTGTTCGGGTCATTGAGTTATGTTCTTCAACGATGACATGCATGAAAGGCACCTAT  
TTGGTTCATTTGACTTGCACATCTTCTAAAAACAGCAAGAGAAGATTTAGAATCAGTTTGTGCAGAAAATGTTT  
GTTCCATATACTGAAATGGAGATAGAAAATGAACAAGTAGAAAAGCCAGAATTTCTGTGGGCTCTTTACTTC  
AATATGAGAGATTCGTGAGACATCAGCAGGAGCTGTTATAATGATTTACCATCCAACGTTTATGTCTGCTCT  
GGCCAGATTTGGTGTAGGAAATGATAATGCAGTCAACACAGGCTGAAACACTTTCCAGGAAATCTGCCCC  
AATGAAGATTTCTGTCCCCCTCCACCAATCCTGAAGACATTATCCTTGATGGAGACAGTTTACAGCCAGAG  
GCTTCAGAATCCAGTGCATACAGAGGCTAACTCGGAGACTTCAAGGAAAGCACAAACCTTGAAACCTA  
GAGGAGTCTCTGAATAA
```

(SEQ ID NO: 6)

Un'ulteriore sequenza nucleotidica esemplificativa codificante REP1 è:

```
GATATCGAATTCCTGCAGCCCGGGCCACCATGGCGGATACTCTCCCTTCGGAGTTTGTATGTGATCGTAATA  
GGGACGGGTTTGCCTGAATCCATCATTGCAGCTGCATGTTCAAGAAGTGGCCGGAGAGTTCTGCATGTTGAT  
TCAAGAAGCTACTATGGAGGAAACTGGGCCAGTTTAGCTTTTCAGGACTATTGTCTGGCTAAAGGAATAC  
CAGGAAAACAGTGACATTGTAAGTGACAGTCCAGTGTGGCAAGACCAGATCCTTGAAAAATGAAGAAGCCATT  
GCTCTTAGCAGGAAGGACAAAACATTTCAACATGTGGAAGTATTTGTTATGCCAGTCAGGATTTGCATGAA  
GATGTCGAAGAAGCTGGTGCACATGCAGAAAATCATGCTCTTGTGACATCTGCAAACTCCACAGAAGCTGCA  
GATTCGTCCCTTCTGCTACGGAGGATGAGTCATTAAGCACTATGAGCTGTGAAATGCTCACAGAACAACCT  
CCAAGCAGCGATCCAGAGAATGGCTAGAAGTAAATGGTGTGAAGTGACAGGGGAAAAAGAAAACCATTTGT  
GATGATAAAAATTTGTGTGCCATCAACTTCAGCAGAAGACATGAGTGAAAAATGTGCCATAGCAGAAGATACC  
ACAGAGCAACCAAGAAAAACAGAATTACTTACTCACAATATTAAGAAGGCGAGGAGATTTAATATGAT  
TTAGTATCAAAGCTGCTGTATTCTCGAGGATTAATAATGATCTTCTAATCAAATCTAATGTTAGTCGATAT  
GCAGAGTTTAAAAATATTACCAGGATTCCTGCAATTCGAGAAGGACGAGTGGAACAGGTTCCGTGTTCCAGA  
GCAGATGTCTTTAATAGCAAAACCTTACTATGGTAGAAAAGCGAATGCTAATGAAATTTCTTACATTTTGT  
ATGGAATATGAGAAATATCCTGATGAATATAAAGGATATGAAGAGATCACATTTTATGAATATTTAAAGACT  
CAAAAATTAACCCCAACCTCCAATATATTGTCATGCATTCAATTGCAATGACATCAGAGACAGCCAGCAGC  
ACCATAGATGGTCTCAAAGCTACCAAAAACCTTTCTTCACTGTCTTGGGCGGTATGGCAACACTCCATTTTGT  
TTTCTTTATATGGCCAAGGAGAAGTCCCCAGTGTCTTTCGACGATGTGTGCTGTGTTTGGTGGAAATTTAT  
TGCTTTCGCCATTACAGTACAGTGCCTTGTAGTGGACAAGAATCCAGAAAATGTAAGCAATTTATAGATCAG  
TTGGTCAGAGAATAAATCTCTGAGCATTTCCTCGTGGAGGACAGTTACTTTCCTGAGAACATGTGCTCACGT  
GTGCAATACAGGCAGATCTCCAGGGCAGTGTGATTACAGATAGATCTGTCTAAAAACAGATTACAGATCAA  
CAGATTTCCATTTTGACAGTGCAGCAGAGGAACCAGGAACCTTTGTGTTTCGGGTCATTGAGTTATGTTCT  
TCAACGATGACATGCATGAAAGGCACCTATTTGGTTCATTTGACTTGCACATCTTCTAAAAACAGCAAGAGAA  
GATTTAGAATCAGTTGTGCAGAAAATGTTTGTTCATATACTGAAATGGAGATAGAAAATGAACAAGTAGAA  
AAGCCAAGAATTTCTGTGGGCTCTTACTTCAATATGAGAGATTCGTCAGACATCAGCAGGAGCTGTTATAAT  
GATTTACCATCCAACGTTTATGTCTGCTCTGGCCAGATTTGGTGTAGGAAATGATAATGCAGTCAACACAG  
CTGAAAACACTTTTCCAGGAAATCTGCCCAATGAAGATTTCTGTCCCCCTCCACCAATCCTGAAGACATT  
ATCCTTGATGGAGACAGTTTACAGCCAGAGGCTTCAAGATCCAGTGCATACAGAGGCTAACTCGGAGACT  
TCAAGGAAAGCACAAACCTTGAAACCTAGAGGAGTCTCTGAATAA
```

(SEQ ID NO: 7)

Varianti esemplificative di REP1 sono descritte inoltre in WO2012/114090.

Determinazione dell'attività

In un aspetto, la descrizione fornisce un metodo per determinare l'attività della proteina Rab escort 1 (REP1) comprendente i passaggi:

- (a) fornire un campione comprendente REP1;
- (b) mettere a contatto il campione del passaggio (a) con Rab6a, Rab geranylgeranyltransferasi (Rab

GGTasi) ed un substrato donatore di lipidi; e

(c) rivelare il prodotto Rab6a lipidato.

In un altro aspetto, la descrizione fornisce l'uso di Rab6a per determinare l'attività della proteina Rab escort 1 (REP1).

La sensibilità del saggio è un fattore importante da considerare, poiché consente la rivelazione di bassi livelli di un target che è particolarmente importante quando sono presenti piccole quantità di reagenti (ad es., come il caso con i reagenti di terapia genica). Tuttavia, è anche importante portare al massimo l'intervallo dinamico di un segnale di saggio che può, ad esempio, non correlarsi con i reagenti che forniscono una bassa o elevata sensibilità.

Il metodo e l'uso della descrizione sono per testare l'attività di REP1, piuttosto che testare altri agenti che sono coinvolti nella prenilazione di una Rab GTPasi, ad esempio, l'attività di Rab GGTasi o substrati donatore di lipidi, o l'attività delle Rab GTPasi come substrati di prenilazione. Ad esempio, il metodo della descrizione può essere per testare vettori di terapia genica adatti per il rilascio di REP1 in una cellula target o per l'analisi di controllo di qualità di stock di vettori (ad es., stock di farmaci).

In un caso, il campione comprendente REP1 è di una cellula geneticamente ingegnerizzata per esprimere la REP1. Preferibilmente, una cellula è trasfettata o trasdotta con un vettore comprendente una sequenza nucleotidica codificante REP1 per ottenere la cellula geneticamente ingegnerizzata per esprimere la REP1. Preferibilmente, il vettore è un vettore virale.

In un caso, la REP1 è espressa usando un vettore virale comprendente una sequenza nucleotidica codificante REP1.

La cellula (che può essere come popolazione di tali cellule) che è geneticamente ingegnerizzata per esprimere REP1 può essere qualsiasi cellula adatta per l'ingegnerizzazione genetica e l'espressione di REP1, quale una cellula di una linea cellulare (ad es., HEK293). La cellula può essere, ad esempio, una cellula umana o murina. Preferibilmente, la cellula è una cellula umana. La cellula può, ad esempio, essere una cellula retinica quale una cellula dell'epitelio pigmentato retinico o fotorecettore. In un caso, la cellula è una cellula HEK293. In un altro

caso, la cellula è una cellula ARPE-19. In un altro caso, la cellula è una cellula HT1080.

Preferibilmente, Rab6a e/o Rab GGTasi sono di una fonte standard in modo che forniscano una minima o nessuna variazione negli esperimenti ripetuti. Preferibilmente, Rab6a e/o Rab GGTasi sono sostanzialmente puri (ovvero non comprendono sostanzialmente contaminanti proteici che interferiscono con il metodo o l'uso della descrizione).

Di conseguenza, il metodo o l'uso possono comprendere l'esecuzione di una pluralità di esperimenti (ad es., comprendente i passaggi da (a) a (c) in cui i parametri riguardo il campione comprendente REP1 sono variati mentre gli altri parametri (ad es., i parametri riguardo Rab6a, Rab GGTasi e il substrato donatore di lipidi) sono mantenuti costanti. Tali parametri possono includere, ad esempio, la sequenza amminoacidica della proteina pertinente (ad es., REP1), la sequenza nucleotidica codificante REP1 contenuta in un vettore usato per esprimere REP1 in una cellula, il tipo di vettore usato per rilasciare una sequenza nucleotidica codificante REP1 in una cellula (ad es., il tipo di vettore virale, ad esempio il tipo di vettore virale adeno-associato (AAV), la concentrazione di REP1 e/o la molteplicità di infezione (MOI) di un vettore usato per rilasciare una sequenza nucleotidica codificante REP1 in una cellula.

Il termine "attività" è usato nella presente per indicare la capacità di REP1 a facilitare la lipidazione di un Rab GTPasi (ad es., Rab6a). Sebbene REP1 non catalizzi la lipidazione di per sé, è necessaria affinché una Rab GGTasi catalizzi la lipidazione del suo substrato Rab GTPasi. Di conseguenza, l'attività della REP1 può essere misurata determinando la quantità di Rab GTPas (ovvero Rab6a) che è lipidata in alcune condizioni.

Il termine "efficacia" è usato nella presente, in relazione all'efficacia di un vettore comprendente una sequenza nucleotidica codificante REP1 per indicare la capacità del vettore a fornire attività di REP1 in una cellula che è trasfettata o trasdotta dal vettore.

Il termine "prodotto Rab6a lipidato" come usato nella presente si riferisce a Rab6a in cui è stata addizionata la parte caratteristica lipidica. Preferibilmente, il prodotto Rab6a lipidato è Rab6a prenilata, ad esempio un Rab6a geranilgeranilata o una Rab6a biotina-geranilata.

Preferibilmente, il passaggio di rivelazione del prodotto Rab6a lipidato fornisce la quantificazione della quantità

di prodotto Rab6a lipidato.

La rivelazione di Rab6a lipidata può essere eseguita mediante qualsiasi metodo adatto, ad esempio un saggio immunoassorbente legato all'enzima (ELISA), un Western blot, un'autoradiografia (ad es., usando un substrato donatore di lipidi isotopicamente marcato, ad esempio triziato), un metodo cromatografico (ad es., HPLC o FPLC) e/o un metodo basato sulla spettrometria di massa (ad es., LC/MS).

In un caso, il prodotto Rab6a lipidato è rivelato usando un Western blot. In un caso preferito, il prodotto Rab6a lipidato è rilevato usando un ELISA.

A titolo esemplificativo, una reazione di prenilazione può essere eseguita secondo il metodo della descrizione usando un substrato donatore di lipidi biotina-geranilpirofosfato. Il prodotto della reazione può essere sottoposto ad analisi Western blot in cui il prodotto Rab6a lipidato (ovvero Rab6a biotina-geranilato) può essere rilevato mediante incubazione diretta, ad esempio, con un coniugato streptavidina-perossidasi di rafano. La quantificazione di Rab6a lipidata (ovvero Rab6a biotina-geranilata) può essere ottenuta mediante analisi densitometrica del Western blot risultante che può essere eseguita mediante qualsiasi mezzo adatto (ad es., usando il software Image Studio Lite software (LI-COR)).

A titolo di ulteriore esempio, una reazione di prenilazione può essere eseguita secondo il metodo della descrizione usando un substrato donatore di lipidi biotina-geranilpirofosfato. Il prodotto della reazione può essere sottoposto ad un'analisi ELISA in cui Rab6a può essere immobilizzata su una piastra direttamente o usando un anticorpo che è stato attaccato alla piastra (ovvero un ELISA sandwich); e quindi il prodotto Rab6a lipidato (ovvero Rab6a biotina-geranilato) può essere rivelato mediante incubazione, ad esempio, con un coniugato streptavidina-perossidasi di rafano. La quantificazione di Rab6a lipidata (ovvero Rab6a biotina-geranilata) può essere ottenuta mediante qualsiasi mezzo adatto (ad es., rivelazione usando uno spettrofotometro, fluorometro o luminometro).

Ulteriori passaggi di rivelazione possono essere incorporati nel metodo della descrizione, come, se necessario (ad es., per scopi di controllo), quali la rivelazione della quantità di REPI presente nella reazione o rivelazione della quantità di β -actina (ad es., come controllo di carico).

In un caso, il metodo comprende un ulteriore passaggio per confrontare la quantità di prodotto Rab6a lipidato (ad es., prenilato, ad esempio Rab6a geranylgeranilata o biotina-geranilata) con una quantità determinata da un esperimento di controllo quale un esperimento usando un campione noto standard di REP1.

In un altro esempio, il metodo comprende un ulteriore passaggio per confrontare la quantità di prodotto Rab6a lipidato (ad es., Rab6a prenilata, quale geranylgeranilata o biotina-geranilata), con un livello di riferimento.

Il confronto con tali esperimenti di controllo o livelli di riferimento può fornire una misura dell'attività della REP1 rispetto ad uno standard noto o accettato (ad es., migliore o peggiore rispetto allo standard noto o accettato).

Il metodo della descrizione può, ad esempio, essere usato per l'analisi di controllo di qualità di un vettore di terapia genica per il trattamento della coroideremia, preferibilmente una particella vettoriale AAV comprendente una sequenza nucleotidica codificante REP1, in cui l'attività o l'efficacia di produzione del vettore determinata mediante il metodo della descrizione al di sopra di un'attività soglia o in un intervallo target specificato (ad es., mediante confronto con un esperimento di controllo o livello di riferimento) indica che il vettore è adatto per scopi di terapia genica.

Le condizioni della reazione di prenilazione (ad es., che avvengono nel passaggio (b) del metodo della descrizione) non sono particolarmente limitate, a condizione che non interferiscano sostanzialmente con la prenilazione di Rab6a.

Il campione comprendente REP1 può essere formulato in qualsiasi forma adatta, ad esempio, il campione può essere preparato in un tampone di prenilazione comprendente HEPES circa 50 mM, NaCl 50 mM, MgCl₂ 2 mM, DTT 1 mM e cocktail di inibitori della proteasi (Roche) a circa pH 7.5.

Il campione comprendente REP1, ad esempio, può comprendere circa 1-100, 1-75, 1-50, 1-40, 1-30, 1-20 o 1-10 µg di proteina totale. Il campione comprendente REP1, ad esempio, può comprendere circa 10-100, 10-75, 10-50, 10-40, 10-30 o 10-20 µg di proteina totale. Preferibilmente, il campione comprendente REP1 comprende circa 10-30 µg di proteina totale, ad esempio, circa 10, 15, 20, 25 o 30 µg di proteina totale.

La Rab6a può, ad esempio, essere ad una concentrazione di circa 1-25, 1-20, 1-15, 1-10 o 1-5 µM,

preferibilmente circa 1-5 μM . La Rab6a può, ad esempio, essere ad una concentrazione di circa 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 μM , preferibilmente circa 4 μM .

La Rab GGTasi può, ad esempio, essere ad una concentrazione di circa 1-25, 1-20, 1-15, 1-10, 1-5 o 1-2,5 μM , preferibilmente circa 1-2,5 μM . La Rab GGTasi può, ad esempio, essere ad una concentrazione di circa 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 μM , preferibilmente circa 2 μM .

Il substrato donatore di lipidi (ad es., biotina-geranilpirofosfato (BGPP)) può, ad esempio, essere ad una concentrazione di circa 1-25, 1-20, 1-15, 1-10 o 1-5 μM , preferibilmente circa 1-5 μM . Il substrato donatore di lipidi (ad es., biotina-geranilpirofosfato (BGPP)) ad esempio, può essere ad una concentrazione di circa 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 μM , preferibilmente circa 4 μM .

La reazione di prenilazione può essere eseguita in qualsiasi tampone adatto, ad esempio, la reazione può essere eseguita in un tampone di prenilazione comprendente HEPES circa 50 mM, NaCl 50 mM, MgCl_2 2 mM, DTT 1 mM e cocktail di inibitori della proteasi (Roche) a circa pH 7.5.

Le reazioni di prenilazione possono essere eseguite per qualsiasi periodo di tempo adatto a qualsiasi temperatura adatta (ad es., circa 37°C). Ad esempio, le reazioni di prenilazione possono essere eseguite per circa 1-10, 1-7,5, 1-5, 1-2,5 o 1-2 ore, preferibilmente circa 1-2 ore. Le reazioni di prenilazione, ad esempio, possono essere eseguite per circa 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 ore, preferibilmente circa 2 ore.

Coroideremia

La coroideremia è una degenerazione progressiva legata al cromosoma X raro della coroide, epitelio pigmentato retinico e fotorecettori dell'occhio. La storia tipica naturale nei maschi affetti è l'insorgenza di cecità notturna durante gli anni dell'adolescenza e quindi perdita progressiva di visione periferica durante i 20 e i 30 anni che porta ad una cecità completa nei 40 anni. Le portatrici donne hanno sintomi lievi, più in particolare cecità notturna, ma possono occasionalmente avere un fenotipo più grave.

La coroideremia è provocata da mutazioni del gene *CHM*, che è situato sulla regione 21q del cromosoma X. La proteina Rab escort 2 (REP2) che è per il 75% omologa a REP1, compensa qualsiasi carenza di REP1 nella maggior parte di cellule dell'organismo. Tuttavia, per ragioni che non sono ancora chiare, REP2 non è in grado

di compensare la carenza di REP1 nell'occhio. Ciò porta all'insufficiente attività della proteina Rab escort di mantenere la prenilazione normale delle Rab GTPasi target e genera disfunzione cellulare ed infine morte cellulare, influenzando principalmente retina esterna e coroide.

La coroideremia può essere trattata con successo fornendo copie funzionali del transgene di REP1 nelle cellule interessate dell'occhio (MacLaren, R.E. *et al.* (2014) *Lancet* 383: 1129-37).

Vettori

Un vettore è uno strumento che consente o facilita il trasferimento di una entità da un ambiente in un altro. Secondo la descrizione, e a titolo esemplificativo, alcuni vettori usati nelle tecniche di acido nucleico ricombinante consentono il trasferimento di entità quali un segmento di acido nucleico (ad es., un segmento di DNA eterologo, quale un segmento di cDNA eterologo), in una cellula target. Il vettore può servire a scopo di mantenimento dell'acido nucleico eterologo (ad es., DNA o RNA) facilitando la replicazione del vettore comprendente un segmento di acido nucleico o facilitando l'espressione della proteina codificata da un segmento di acido nucleico.

I vettori possono essere non virali o virali. Esempi di vettori usati nelle tecniche di acido nucleico ricombinante includono, senza limitazione, plasmidi, cromosomi, cromosomi artificiali e virus. Il vettore può anche essere, ad esempio, un acido nucleico nudo (ad es., DNA o RNA). Nella sua più semplice forma, il vettore può di per sé essere un nucleotide di interesse.

I vettori usati nella descrizione, ad esempio, possono essere vettori plasmidici o virali e possono includere un promotore per l'espressione di un polinucleotide e opzionalmente un regolatore del promotore.

Vettori virali

In un caso preferito, il vettore della descrizione è un vettore virale. Preferibilmente, il vettore virale è sotto forma di una particella virale vettoriale.

Il vettore virale può essere, ad esempio, un vettore virale adeno-associato (AAV), retrovirale, lentivirale o adenovirale. Preferibilmente, il vettore virale è un vettore AAV.

L'espressione "vettore di terapia genica" è usato nella presente per indicare un vettore che è adatto per l'uso nella

terapia genica ed include, ad esempio, vettori virali (ad es., AAV) e particelle vettoriali.

Varianti, derivati, analoghi, omologhi e frammenti

Oltre alle proteine e nucleotidi specifici citati nella presente, la descrizione include anche l'uso di loro varianti, derivati, analoghi, omologhi e frammenti.

Nel contesto della descrizione, una variante di qualsiasi data sequenza è una sequenza in cui la sequenza specifica di residui (residui amminoacidici o di acido nucleico) sono stati modificati in un modo che il polipeptide o il polinucleotide in questione mantenga sostanzialmente la sua funzione. Una sequenza variante può essere ottenuta mediante l'addizione, delezione, sostituzione, modificazione, sostituzione e/o variazione di almeno un residuo presente nella proteina naturale.

Il termine "derivato" come usato nella presente, in relazione a proteine o polipeptidi della descrizione include qualsiasi sostituzione, variazione, modificazione, sostituzione, delezione e/o addizione di uno (o più) residui amminoacidici da o nella sequenza a condizione che la proteina o il polipeptide risultante mantenga sostanzialmente almeno una delle sue funzioni endogene.

Il termine "analogo" come usato nella presente, in relazione a polipeptidi o polinucleotidi include qualsiasi mimetico, ovvero un composto chimico che possiede almeno una delle funzioni endogene dei polipeptidi o polinucleotidi che esso imita.

Tipicamente, si possono apportare sostituzioni amminoacidiche ad esempio, da 1, 2 o 3 a 10 o 20 sostituzioni a condizione che la sequenza modificata mantenga sostanzialmente l'attività o la capacità richiesta. Le sostituzioni amminoacidiche possono includere l'uso di analoghi non naturali.

Le proteine usate nella descrizione possono anche avere delezioni, inserzioni o sostituzioni di residui amminoacidici che producono una variazione silente e determinano una proteina funzionalmente equivalente. Sostituzioni amminoacidiche volontarie possono essere apportate in base alla similarità di polarità, carica, solubilità, idrofobicità, idrofilicità e/o natura anfipatica dei residui purchè la funzione endogena sia mantenuta. Ad esempio, amminoacidi a carica negativa includono acido aspartico e acido glutammico; amminoacidi a carica positiva includono lisina e arginina; e amminoacidi con gruppi di testa polari non cariche aventi valori di

idrofilicità simili includono asparagina, glutammina, serina, treonina e tirosina.

Si possono apportare sostituzioni conservative, ad esempio, secondo la tabella di seguito. Gli amminoacidi nello stesso blocco nella seconda colonna e preferibilmente nella stessa riga nella terza colonna possono essere sostituiti uno con l'altro:

ALIFATICO	Non-polare	G A P
		I L V
	Polare – non carico	C S T M
		N Q
	Polare – carico	D E
		K R H
AROMATICO		F W Y

Il termine "omologo" come usato nella presente indica un'entità avente una certa omologia con la sequenza amminoacidica di tipo selvatico e la sequenza nucleotidica di tipo selvatico. Il termine "omologia" può essere sinonimo di identità.

Una sequenza omologa può includere una sequenza amminoacidica che può essere identica almeno al 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% o 90% preferibilmente identica almeno al 95% o 97% o 99% con la sequenza in oggetto. Tipicamente, gli omologhi comprenderanno gli stessi siti attivi ecc. della sequenza amminoacidica in oggetto. Sebbene l'omologia possa anche essere considerata in termini di similarità (ovvero residui amminoacidici aventi proprietà/funzioni chimiche simili) nel contesto della descrizione si preferisce esprimere l'omologia in termini di identità di sequenza.

Una sequenza omologa può includere una sequenza nucleotidica che può essere identica almeno per il 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% o 90% preferibilmente identica almeno per il 95% o 97% o 99% alla sequenza in oggetto. Sebbene omologia possa anche essere considerata in termini di similarità, nel contesto della descrizione si preferisce esprimere omologia in termini di identità di sequenza.

Preferibilmente, in riferimento ad una sequenza che ha una percentuale di identità con una qualsiasi di SEQ ID NO descritta in dettaglio nella presente si riferisce ad una sequenza che ha la percentuale di identità indicata sull'intera lunghezza della SEQ ID NO indicata.

I confronti di omologia possono essere condotti visivamente o più usualmente con l'ausilio di programmi di confronto di sequenza facilmente disponibili. Questi programmi informatici disponibili in commercio possono

calcolare la percentuale di omologia o di identità tra due o più sequenze.

La percentuale di omologia può essere calcolata su sequenze contigue, ovvero una sequenza è allineata con l'altra sequenza e ciascun amminoacido in una sequenza è direttamente confrontato con il corrispondente amminoacido nell'altra sequenza, un residuo per volta. Ciò è definito un allineamento "senza gap". Tipicamente, tali allineamenti senza gap sono eseguiti soltanto su un numero di residui relativamente piccolo.

Sebbene ciò è un metodo molto semplice e coerente, esso non riesce a tenere in considerazione che, ad esempio, in una coppia di sequenze altrimenti identiche, una inserzione o delezione nella sequenza nucleotidica può indurre l'esclusione dei successivi codoni dall'allineamento, determinando così probabilmente una grande riduzione della percentuale di omologia quando è eseguito un allineamento globale. Di conseguenza, la maggior parte dei metodi di confronto di sequenza sono progettati per produrre allineamenti ottimali che tengono in considerazione le possibili inserzioni e delezioni senza penalizzare inutilmente il punteggio di omologia totale. Ciò è ottenuto inserendo "gap" nell'allineamento di sequenza per tentare di portare al massimo l'omologia locale. Tuttavia, questi metodi più complessi attribuiscono "penalità di gap" a ciascun gap che è presente nell'allineamento cosicché per lo stesso numero di amminoacidi identici, un allineamento di sequenza con meno gap possibili, che indica maggiore affinità tra le due sequenze confrontate, otterrà un punteggio superiore ad una con molti gap. Sono tipicamente usati "costi di gap affini" che caricano un costo relativamente elevato per l'esistenza di un gap ed una penalità inferiore per ciascun successivo residuo nel gap. Ciò è il sistema di punteggio dei gap più comunemente usato. Elevate penalità di gap naturalmente produrranno allineamenti ottimizzati con meno gap. La maggior parte dei programmi di allineamento consente la modificazione delle penalità di gap. Tuttavia, si preferisce l'uso di valori di default quando si usa tale software per i confronti di sequenza. Ad esempio, quando si usa un pacchetto GCG Wisconsin Bestfit, la penalità di gap di default per le sequenze amminoacidiche è -12 per un gap e -4 per ciascuna estensione.

Il calcolo della percentuale massima di omologia pertanto innanzitutto richiede la produzione di un allineamento ottimale tenendo in considerazione le penalità dei gap. Un programma informatico adatto per eseguire tale allineamento è il pacchetto GCG Wisconsin Bestfit (University of Wisconsin, U.S.A.; Devereux et al. (1984)

Nucleic Acids Res. 12: 387). Esempi di altri software che possono eseguire confronti di sequenza includono, senza limitazioni, pacchetto BLAST (si veda Ausubel et al. (1999) *ibid* - Ch. 18), FASTA (Atschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 403-410) ed il pacchetto GENWORKS di strumenti di confronto. Sia BLAST sia FASTA sono disponibili per la ricerca offline e online (si veda Ausubel et al. (1999) *ibid*, pagine da 7-58 a 7-60). Tuttavia, per alcune applicazioni, si preferisce l'uso del programma GCG Bestfit. Un altro strumento, definito BLAST 2 Sequences è anche disponibile per confrontare le sequenze proteiche e nucleotidiche (si veda *FEMS Microbiol. Lett.* (1999) 174: 247-50; e *FEMS Microbiol. Lett.* (1999) 177: 187-8).

Sebbene la percentuale di omologia finale possa essere misurata in termini di identità, il processo di allineamento stesso non si basa tipicamente su un confronto a coppie tutto-o-niente. Invece è generalmente usata una matrice di punteggio di similarità graduale che attribuisce punteggi a ciascun confronto a coppie in base alla similarità chimica o distanza evolutiva. Un esempio di tale matrice comunemente usata è la matrice BLOSUM62 – la matrice di default per il pacchetto di programmi BLAST. I programmi GCG Wisconsin generalmente usano i valori di default pubblici o una tabella di confronto dei simboli abituali se fornita (si veda il manuale dell'utilizzatore per ulteriori dettagli). Per alcune applicazioni, si preferisce l'uso dei valori di default pubblici per il pacchetto GCG, o nel caso di altro software, la matrice di default, quale BLOSUM62.

Una volta che il software ha prodotto un allineamento ottimale è possibile calcolare la percentuale di omologia, preferibilmente la percentuale di identità di sequenza. Il software tipicamente esegue ciò come parte del confronto di sequenza e genera un risultato numerico.

"Frammenti" di polipeptidi o polinucleotidi a lunghezza completa della descrizione sono anche varianti ed il termine tipicamente si riferisce ad una regione selezionata del polipeptide o polinucleotide che è di interesse funzionalmente o, ad esempio, in un saggio. "Frammento" pertanto si riferisce ad una sequenza amminoacidica o di acido nucleico che è una porzione di un polipeptide o polinucleotide a lunghezza completa.

Tali varianti possono essere preparate usando tecniche del DNA ricombinante standard quali mutagenesi sito-diretta. Quando si devono apportare inserzioni, possono essere fatte dal DNA sintetico codificante l'inserzione insieme alle regioni fiancheggianti 5' e 3' corrispondenti alla sequenza naturale su ogni lato del sito di inserzione.

Le regioni fiancheggianti conterranno siti di restrizione vantaggiosi corrispondenti ai siti nella sequenza naturale in modo che la sequenza possa essere tagliata con l'enzima(i) adatto(i) ed il DNA sintetico ligato nel taglio. Il DNA è quindi espresso secondo la descrizione per produrre la proteina codificata. Questi metodi sono soltanto rappresentativi di numerose tecniche standard note nella tecnica per la manipolazione di sequenze di DNA e si possono anche usare altre tecniche note.

Ottimizzazione del codone

I polinucleotidi usati nella presente descrizione possono essere codone-ottimizzati. L'ottimizzazione del codone è stata precedentemente descritta in WO 1999/41397 e WO 2001/79518. Le Cellule differenti differiscono nel loro uso di particolari codoni. Questo codon bias (preferenza del codone) corrisponde ad una preferenza nell'abbondanza relativa di particolari tRNA nel tipo cellulare. Alterando i codoni nella sequenza in modo che essi siano adatti a corrispondere all'abbondanza relativa dei corrispondenti tRNA, è possibile aumentare l'espressione. Analogamente è possibile ridurre l'espressione scegliendo deliberatamente codoni per i quali i corrispondenti tRNA sono noti come rari nel particolare tipo cellulare. Pertanto, è disponibile un grado addizionale di controllo trasduzionale.

ESEMPI

Materiali e metodi (Esempi 1-2)

Trasduzione e raccolta cellulare

Cellule HEK293 coltivate sono state trattate con AAV2/2-REP1 ad un intervallo di molteplicità di infezione (MOI, particelle genomiche/cellule). rAAV2/2-GFP è stato usato in parallelo come vettore controllo e la fluorescenza è stata monitorata per l'insorgenza dell'espressione transgenica.

Gli esperimenti su cellule non trasdotte e trasdotte con +AAV-GFP e trasdotte con +AAV-REP1 sono state condotti in parallelo.

I lisati cellulari sono stati preparati il giorno 5 post trasduzione usando il seguente protocollo: le cellule sono state lavate con PBS ed incubate per 5 min con tampone di prenilazione, pH 7.5 (HEPES 50 mM, NaCl 50 mM, MgCl₂ 2 mM, DTT 1 mM e un cocktail di inibitore della proteasi (Roche)) su ghiaccio; le cellule sono state

quindi raschiate usando un raschietto per cellule in una provetta 1,5 ml ed incubate su ghiaccio per 15 min; successivamente le cellule sono state disgregate spingendole 20 volte attraverso un ago per siringa a 26-G attaccato ad una siringa da 1 ml.

Le cellule lisate sono state centrifugate per 5 min a 1500 xg a 4°C. Il surnatante è stato quindi trasferito in provette di cellulosa propionato e centrifugato per 1 ora a 100000xg a 4°C. Il surnatante del secondo passaggio di centrifugazione è stato usato per le reazioni di prenilazione in vitro (descritte di seguito).

Quantificazione della proteina totale

La concentrazione di proteina cellulare totale è stata quantificata usando il metodo di Bradford secondo le istruzioni del produttore (Quick Start™ Bradford 1x Dye Reagent, BioRad, N. 500-0205). I valori campione sono stati estrapolati da una curva standard.

Reazione di prenilazione in vitro

Le reazioni di prenilazione sono state preparate usando il lisato cellulare congelato (10-30 µg), Rab GGTasi 2 µM, proteina Rab 4 µM (Rab27a o Rab6a) e biotina-geranilpirofosfato 5 µM (BGPP) come donatore di lipidi nel tampone di prenilazione. Tutte le reazioni sono state integrate con GDP fresco (guanosina difosfato, 20 µM) e DTT (1 mM).

Per i campioni di controllo positivo, è stata addizionata REP1 di pesce (si vedano i singoli esperimenti per le quantità) nella reazione di prenilazione contenente il lisato di cellule non trasdotte.

Le reazioni sono state incubate per 2 ore a 37°C e quindi arrestate mediante l'aggiunta di tampone campione (tampone Laemmli, concentrato 2×, Sigma N. S3401). Questo tampone contiene 4% di SDS, 20% di glicerolo, 10% di 2-mercaptoetanololo, 0,004% di bromofenolo blu e Tris HCl 0,125 M, pH circa. 6.8.

I Western blot (WB) sono stati eseguiti per rilevare la REP-1 umana, β-actina (come controllo di carico) e la proteina Rab biotinilata (Rab27a o Rab6a).

Per la rilevazione di REP1 umana, è stato usato l'anticorpo monoclonale murino della Millipore (clone 2F1, N. MABN52). Per la rivelazione della β-actina, è stato usato l'anticorpo monoclonale murino della Thermo Fisher Scientific (clone AC-15, N. AM4302). Entrambe le rivelazioni sono state eseguite mediante un passaggio di

marcatura dell'anticorpo secondario (anticorpo di asino anti-HRP murina, Abcam, N. ab98799).

L'incorporazione del donatore di lipidi biotinilato nel substrato Rab adatta è stata rivelata mediante incubazione diretta con streptavidina-HRP (Thermo Fisher Scientific, N. 43-4323).

Tutte le membrane sono state rivelate usando il substrato ECL e il sistema di rivelazione Odyssey FC (LI-COR).

Le intensità delle bande sono state quantitativamente analizzate usando il software Image Studio Lite (LI-COR).

Esempio 1 – Rab27a come substrato di prenilazione

Per testare la sensibilità di un saggio di prenilazione usando Rab27a come substrato, sono stati eseguiti esperimenti in parallelo usando le seguenti cellule:

- (a) cellule non trasdotte;
- (b) cellule trasdotte con AAV-GFP ad una MOI di 10.000; e
- (c) cellule trasdotte con AAV-REP1 ad una MOI di 10.000.

Le reazioni di prenilazione sono state preparate usando 10 µg di lisato in un volume totale di 12,5 µl. I controlli positivi sono stati arricchiti con 2 µM di REP1 di pesce.

I risultati indicano che Rab27a è un substrato per il saggio di prenilazione per valutare la funzione di REP1 dopo trasduzione di cellule con AAV-REP1 (Figura 1). Tuttavia, il segnale della semiquantificazione WB non è molto forte.

Questo studio è stato ripetuto con una quantità aumentata di proteina cellulare totale per aumentare l'intensità della banda WB.

Le reazioni di prenilazione sono state preparate usando 30 µg di lisato in un volume totale di 22 µl. I controlli positivi sono stati arricchiti con 1 µM di REP1 di pesce.

I risultati confermano che Rab27a funziona come substrato per il saggio di prenilazione per valutare la funzione di REP1 dopo la trasduzione di cellule con AAV-REP1 (Figura 2). Inoltre, la forza del segnale WB è aumentata rispetto ai dati ottenuti usando 10 µg di lisato. Tuttavia, il segnale non è ancora molto forte. Idealmente, sarebbe osservato un aumento maggiore di proteina Rab prenilata quando le cellule sono trasdotte con AAV-REP1.

Esempio 2 – Rab6a come substrato di prenilazione

Per testare la sensibilità di un saggio di prenilazione usando Rab6a come substrato, sono stati eseguiti esperimenti in parallelo usando le seguenti cellule (stessi lisati cellulari usati nell'Esempio 1):

- (a) cellule non trasdotte;
- (b) cellule trasdotte con AAV-GFP ad una MOI di 10.000; e
- (c) cellule trasdotte con AAV-REP1 ad una MOI di 10.000.

Le reazioni di prenilazione sono state preparate usando 20 µg di lisato in un volume totale da 20 µl. I controlli positivi sono stati arricchiti con 1 µM di REP1 di pesce.

I risultati indicano che il Rab6a è un substrato efficace per il saggio di prenilazione per valutare la funzione di REP1 dopo la trasduzione di cellule con AAV-REP1 (Figura 3).

La forza del segnale WB è aumentata approssimativamente 10 volte per le cellule trasdotte AAV-REP1 rispetto ai dati mostrati in Figura 2, anche se è stata usata meno proteina totale. Inoltre, l'intensità di banda per i controlli positivi è approssimativamente 100 volte superiore rispetto ai dati mostrati in Figura 2 confermando la sensibilità aumentata dei saggi a base di Rab6a.

I dati dimostrano anche che la sensibilità aumentata consente la rivelazione di differenze a livelli endogeni che rendono il saggio più accurato.

Dopo la dimostrazione riuscita della sensibilità del saggio aumentata fornita dall'uso di Rab6a come substrato di prenilazione, abbiamo ripetuto il saggio usando MOI differenti di AAV-REP1, per studiare se la prenilazione di Rab6a si correla con la quantità di AAV-REP1.

Gli esperimenti sono stati eseguiti in parallelo usando le seguenti cellule:

- (a) cellule non trasdotte;
- (b) cellule trasdotte con AAV-REP1 ad una MOI di 250;
- (c) cellule trasdotte con AAV-REP1 ad una MOI di 1000;
- (d) cellule trasdotte con AAV-REP1 ad una MOI di 5.000;
- (e) cellule trasdotte con AAV-REP1 ad una MOI di 10.000; e
- (f) cellule trasdotte con AAV-REP1 ad una MOI di 20.000.

Le reazioni di prenilazione sono state preparate usando 20 µg di lisato in un volume totale di 15 µl. Il controllo positivo è stato arricchito con 0,5 µM di REP1 di pesce.

I risultati confermano che Rab6a è un substrato efficace per il saggio di prenilazione per valutare la funzione di REP1 dopo la trasduzione di cellule con AAV-REP1 (Figura 4) e inoltre dimostrano che l'incorporazione del donatore di lipidi biotinilato in Rab6a si correla con la quantità di AAV-REP1 usata per la trasduzione cellulare.

Dopo la convalida di Rab6a come substrato di saggio efficace, abbiamo quindi testato il vettore AAV-REP1 attualmente in uso nella nostra sperimentazione clinica di Fase 1 (MacLaren, R.E. et al. (2014) Lancet 383: 1129-37) .

Gli esperimenti sono stati eseguiti in parallelo usando le seguenti cellule:

- (a) cellule non trasdotte (N. 29, N. 30 e N. 31);
- (b) cellule trasdotte con AAV-REP1 ad una MOI di 10000 (N. 32, N. 33 e N. 34); e
- (c) cellule trasdotte con AAV-REP1 di qualità GMP ad una MOI di 10000 (N. 35, N. 36 e N. 37).

Reazioni di prenilazione sono state preparate usando 20 µg di lisato in un volume totale di 15 µl. Il controllo positivo è stato arricchito con 0,5 µM di REP1 di pesce.

I risultati sono in conformità con gli esperimenti precedenti e confermano che l'incorporazione del donatore di lipidi biotinilato in Rab6a si correla con la quantità di AAV-REP1 usata per la trasduzione cellulare (Figura 5).

Esempio 3 – Rab6a come substrato nella reazione di prenilazione usando cellule ARPE-19

Trasduzione e raccolta cellulare

Le cellule ARPE-19 coltivate sono state trattate con rAAV2/2-REP1 ad una MOI di 10.000 particelle genomiche/cellula. I lisati cellulari sono stati preparati il giorno 13 post-trasduzione: le cellule sono state lavate con PBS ed incubate con tampone di prenilazione, pH 7.5 (HEPES 50 mM, NaCl 50 mM, MgCl₂ 2 mM, DTT 1 mM e cocktail di inibitori della proteasi (Roche)) su ghiaccio. Le cellule sono state raschiate usando un raschietto per cellule in una provetta da 1,5 ml ed incubate su ghiaccio per 15 min. Le cellule sono state disgregate spingendole 20 volte attraverso un ago per siringa a 26-G attaccato ad una siringa da 1 ml. Le cellule sono state centrifugate per 5 min a 1.500 g, 4°C. Il surnatante è stato quindi trasferito in provette di cellulosa

propionato e centrifugato a 100.000 g per 1 ora a 4°C. Il surnatante è stato usato per la reazione di prenilazione in vitro.

Quantificazione della proteina totale

La proteina cellulare totale è stata quantificata usando il metodo di Bradford secondo le istruzioni del produttore (Quick Start™ Bradford 1x Dye Reagent, BioRad, N. 500-0205).. I valori del campione sono stati estrapolati da una curva standard.

Reazione di prenilazione in vitro

Le reazioni di prenilazione sono state preparate usando lisato cellulare congelato (15 µg), Rab GGTasi 2 µM, 4 µM di proteina Rab (Rab6a) e 5 µM di biotina-geranilpirofosfato come donatore di lipidi, nel tampone di prenilazione. Tutte le reazioni sono state integrate con GDP (20 µM) e DTT (1 mM) freschi. Nei controlli di controllo positivo, è stata addizionata REP1 di pesce (si vedano gli esperimenti per la quantità) nella reazione di prenilazione contenente lisato di cellule non trasdotte.

Le reazioni sono state incubate per 2 ore a 37°C e quindi arrestate mediante l'aggiunta di tampone campione SDS-PAGE.

Western blot (WB) è stato eseguito per rivelare REP1 umana, β-actina (controllo di carico) e proteina Rab biotinilata (Rab27a o Rab6a). Per la rivelazione di REP1 umana, è stato usato un anticorpo monoclonale murino della Millipore (clone 2F1, N. MABN52). Per la rivelazione di β-actina, è stato usato un anticorpo monoclonale murino della Thermo Fisher Scientific (clone AC-15, N. AM4302). Entrambe le rivelazioni sono state eseguite mediante una fase di marcatura dell'anticorpo secondario (anticorpo di asino anti-HRP murino, Abcam, N. ab98799). L'incorporazione del donatore di lipidi biotinilato nel substrato Rab adatto è stata rivelata mediante incubazione diretta con streptavidina-HRP (Thermo Fisher Scientific, N. 43-4323). Tutte le membrane sono state rivelate usando il substrato ECL e il sistema di rilevamento Odyssey FC (LI-COR). Le intensità delle bande sono state quantitativamente analizzate usando il software Image Studi Lite (LI-COR).

Risultati e discussione

Per testare il saggio di prenilazione usando Rab6a come substrato in cellule ARPE-19 (cellule dell'epitelio

pigmentato retinico umano), gli esperimenti sono stati eseguiti in parallelo usando le seguenti cellule:

- (a) Cellule non trasdotte (N. 86 e N. 87); e
- (b) Cellule + AAV-REP1 MOI 10.000 (N. 90 e N. 91) – vettore di qualità R&D

Le reazioni di prenilazione sono state preparate usando 15 µg di lisato in volume totale di 45 µl. Il controllo positivo è stato arricchito con 0,1 µM di REP1 di pesce.

I risultati indicano che Rab6a funziona come substrato per il saggio di prenilazione valutando la funzione di REP1 dopo trasduzione delle cellule ARPE-19 con AAV-REP1 (Figura 6).

Esempio 4 – Rab6a come substrato nella reazione di prenilazione usando cellule HT1080

Trasduzione e raccolta cellulare

Le cellule HT1080 coltivate sono state trattate con rAAV2/2-REP1 ad una MOI di 10.000 particelle genomiche/cellula. I lisati cellulari sono stati preparati il giorno 5 post-trasduzione: le cellule sono state lavate con PBS ed incubate con tampone di prenilazione pH 7.5 (HEPES 50 mM, NaCl 50 mM, MgCl₂ 2 mM, DTT 1 mM e cocktail di inibitori della proteasi (Roche)) su ghiaccio. Le cellule sono state raschiate usando un raschietto per cellule in una provetta da 1,5 ml ed incubate su ghiaccio per 15 min. Le cellule sono state disgregate spingendole 20 volte attraverso un ago per siringa a 26-G attaccato ad una siringa da 1 ml. Le cellule sono state centrifugate per 5 min a 1.500 g, 4°C. Il surnatante è stato quindi trasferito in provette di cellulosa propionato e centrifugate a 100.000 g per 1 ora a 4°C. Il surnatante è stato usato per la reazione di prenilazione in vitro.

Quantificazione della proteina totale

La proteina cellulare totale è stata quantificata usando il metodo di Bradford secondo le istruzioni del produttore (Quick Start™ Bradford 1x Dye Reagent, BioRad, N. 500-0205). I valori campione sono stati estrapolati da una curva standard.

Reazione di prenilazione in vitro

Le reazioni di prenilazione sono state preparate usando il lisato cellulare congelato (20 µg), Rab GGTasi 2 µM, 4 µM di proteina Rab (Rab6a) e 5 µM di biotina-geranilpirofosfato come donatore di lipidi, nel tampone di

prenilazione. Tutte le reazioni sono state integrate con GDP fresco (20 μ M) e DTT (1 mM). Nei campioni di controllo positivi è stata addizionata REP1 di pesce (si vedano gli esperimenti per la quantità) alla reazione di prenilazione contenente lisato di cellule non trasdotte.

Le reazioni sono state incubate per 2 ore a 37°C e quindi arrestate mediante addizione di tampone campione SDS-PAGE.

Western blotting (WB) è stato eseguito per rivelare REP-1 umana, β -actina (controllo di carico) e la proteina Rab biotinilata (Rab27a o Rab6a). Per la rilevazione di REP1 umana, è stato usato un anticorpo monoclonale murino della Millipore (clone 2F1, N. MABN52). Per la rivelazione della β -actina, è stato usato un anticorpo monoclonale murino della Thermo Fisher Scientific (clone AC-15, N. AM4302). Entrambe le rivelazioni sono state eseguite mediante un passaggio di marcatura dell'anticorpo secondario (anticorpo di asino anti-HRP murina, Abcam, N. ab98799). L'incorporazione del donatore di lipidi biotinilato nel substrato Rab adatto è stata rivelata mediante incubazione diretta con streptavidina-HRP (Thermo Fisher Scientific, N. 43-4323). Tutte le membrane sono state rivelate usando il substrato ECL e il sistema di rivelazione Odyssey FC (LI-COR). Le intensità delle bande sono state analizzate quantitativamente usando il software Image Studi Lite (LI-COR).

Risultati e discussione

Per testare il saggio di prenilazione usando Rab6a come substrato in cellule HT1080, sono stati eseguiti esperimenti in parallelo usando le seguenti cellule:

- (a) Cellule non trasdotte (N. 56 e N. 57);
- (b) Cellule + AAV-REP1 MOI 10.000 (N. 60 e N. 61) – vettore di qualità R&D; e
- (c) Cellule + AAV-REP1 MOI 10.000 (N. 64 e N. 65) – vettore di qualità clinica.

Le reazioni di prenilazione sono state preparate usando 20 μ g di lisato in un volume totale di 20 μ l. Il controllo positivo è stato arricchito con 0,1 μ m di REP1 di pesce.

I risultati indicano che Rab6a funziona come substrato per il saggio di prenilazione per valutare la funzione di REP1 dopo la trasduzione di cellule HT1080 con AAV-REP1 (Figura 7).

Esempio 5 – Confronto di Rab27a e Rab6a come substrati nelle reazioni di prenilazione

Sono stati usati gli stessi lisati cellulari dell'esperimento mostrato in Figura 4:

- (a) Cellule non trasdotte;
- (b) Cellule + AAV-REP1 MOI 250;
- (c) Cellule + AAV-REP1 MOI 1.000;
- (d) Cellule + AAV-REP1 MOI 5.000;
- (e) Cellule + AAV-REP1 MOI 10.000; e
- (f) Cellule + AAV-REP1 MOI 20.000.

Le reazioni di prenilazione sono state preparate usando 20 µg di lisato in un volume totale di 15 µl, e 2 substrati differenti: Rab27a e Rab6a. I controlli positivi, uno per ciascun substrato sono stati arricchiti con 0,1 µM REP1 di pesce. I campioni sono stati fatti correre in parallelo su SDS-PAGE e rivelati simultaneamente.

Risultati e discussione

Sia Rab27a sia Rab6a funzionano come substrato per il saggio di prenilazione per valutare la funzione di REP1 dopo trasduzione di cellule con AAV-REP1.

L'incorporazione del donatore di lipidi biotinilato si correla con la quantità di AAV-REP1 usata per la trasduzione cellulare per ciascuno dei substrati usati (Figura 8).

La densità della banda del Rab6a biotinilato è superiore rispetto al Rab27a, il che indica che Rab6a è un substrato più adatto per un'analisi lineare parallela per la determinazione della potenza relativa.

Esempio 6 – Confronto della prestazione di Rab27a e Rab6a come substrati in reazioni di prenilazione usando condizioni differenti

E' stato preparato il lisato di cellule 293 non trasdotte per l'uso in questo esperimento usando Rab27a e Rab6a.

Le condizioni testate sono mostrate nelle Tabelle in Figura 9. I campioni sono stati fatti correre in parallelo su SDS-PAGE e rivelati simultaneamente.

Risultati e discussione

Sia Rab27a sia Rab6a funzione come substrato per il saggio di prenilazione per valutare la funzione di REP1 endogena.

L'incorporazione del donatore di lipidi biotinilato si correla con la quantità di proteina totale nella reazione per ciascuno dei substrati usati.

Confrontando le condizioni, la concentrazione di substrato Rab nella reazione sembra influenzare maggiormente il segnale.

Vi è un aumento di 2,5 volte nel substrato biotinilato quando è usato Rab6a, rispetto a Rab27a.

Esempio 7 – Confronto di Rab27a e Rab6a come substrati nelle reazioni di prenilazione in lisati trasdotti con AAV2-REP1

Nuovi lisati (in triplicato) sono stati preparati usando MOI crescenti di AAV2-REP1 (materiale R&D):

- (a) Cellule non trasdotte;
- (b) Cellule + AAV-REP1 MOI 100;
- (c) Cellule + AAV-REP1 MOI 500;
- (d) Cellule + AAV-REP1 MOI 1.000;
- (e) Cellule + AAV-REP1 MOI 5.000;
- (f) Cellule + AAV-REP1 MOI 10.000;
- (g) Cellule + AAV-REP1 MOI 20.000; e
- (h) Cellule + AAV-REP1 MOI 50.000.

Le reazioni di prenilazione sono state preparate usando 20 µg di proteina totale, 2 µM di substrato Rab (Rab27a o Rab6a) e 2 µM di Rab GGTasi, in un volume totale di 10 µl. I controlli positivi, uno per ciascun substrato, sono stati arricchiti con 0,1 µM di REP1 di pesce.

I campioni di ciascun triplicato sono stati fatti correre in parallelo su SDS-PAGE e rivelati per il substrato biotinilato (1:10.000), β-actina (1:50.000) come controllo di carico e REP1 umana (1:2.500) usando il software Image Studio Lite. I dati della semiquantificazione della densità di banda per il substrato biotinilato sono stati tracciati usando il software Prism (Figura 10).

Risultati

I livelli di β-actina erano simili in tutti i campioni analizzati. Le cellule non trasdotte (ed i campioni di controllo

positivo) presentavano livello endogeno di REP1. Le cellule trasdotte con AAV-REP1 presentavano un aumento di livelli di REP1 che si correla direttamente con la MOI usata. I controlli positivi presentano incorporazione di biotina più forte, come risultato dell'attività REP1 di pesce

Un'analisi ANOVA a due vie di tutti e tre i replicati con un substrato e MOI come fattori ha riscontrato che entrambi erano altamente significativi ($p < 0,0001$). Il test di confronto multiplo di Bonferroni per l'effetto del substrato ad una data MOI dimostrava una differenza coppia significativa a MOI di 5.000 ($p = 0,0023$) e tutti superiori ($p < 0,0001$).

Discussione

Sia Rab27a sia Rab6a lavorano come substrato per il saggio di prenilazione per valutare la funzione di REP1 dopo trasduzione di cellule con AAV-REP1.

La semiquantificazione della densità di banda per il substrato biotinilato mostrava soltanto i valori per Rab6a significativamente superiori rispetto a quelli ottenuti per Rab27a.

ELENCO SEQUENZA

<110> NightstarX Limited

<120> SAGGIO DI PRENILAZIONE

<130> P108257PCT

<150> GB 1604146.9

<151> 2016-03-10

<160> 9

<170> PatentIn versione 3.5

<210> 1

<211> 208

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ser Thr Gly Gly Asp Phe Gly Asn Pro Leu Arg Lys Phe Lys Leu
1 5 10 15

Val Phe Leu Gly Glu Gln Ser Val Gly Lys Thr Ser Leu Ile Thr Arg
20 25 30

Phe Met Tyr Asp Ser Phe Asp Asn Thr Tyr Gln Ala Thr Ile Gly Ile
35 40 45

Asp Phe Leu Ser Lys Thr Met Tyr Leu Glu Asp Arg Thr Val Arg Leu
50 55 60

Gln Leu Trp Asp Thr Ala Gly Gln Glu Arg Phe Arg Ser Leu Ile Pro
65 70 75 80

Ser Tyr Ile Arg Asp Ser Thr Val Ala Val Val Val Tyr Asp Ile Thr
85 90 95

Asn Val Asn Ser Phe Gln Gln Thr Thr Lys Trp Ile Asp Asp Val Arg
100 105 110

Thr Glu Arg Gly Ser Asp Val Ile Ile Met Leu Val Gly Asn Lys Thr
115 120 125

Asp Leu Ala Asp Lys Arg Gln Val Ser Ile Glu Glu Gly Glu Arg Lys
130 135 140

Ala Lys Glu Leu Asn Val Met Phe Ile Glu Thr Ser Ala Lys Ala Gly
145 150 155 160

Tyr Asn Val Lys Gln Leu Phe Arg Arg Val Ala Ala Ala Leu Pro Gly

165 170 175
Met Glu Ser Thr Gln Asp Arg Ser Arg Glu Asp Met Ile Asp Ile Lys
180 185 190
Leu Glu Lys Pro Gln Glu Gln Pro Val Ser Glu Gly Gly Cys Ser Cys
195 200 205

<210> 2
<211> 627
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 2
atgtccacgg gcgagactt cggaatccg ctgaggaaat tcaagctggt gttcctgggg 60
gagcaaagcg ttggaaagac atctttgatc accagattca tgtatgacag ttttgacaac 120
acctatcagg caacaattgg cattgacttt ttatcaaaaa ctatgtactt ggaggatcga 180
acagtacgat tgcaattatg ggacacagca ggtcaagagc ggttcaggag cttgattcct 240
agctacattc gtgactccac tgtggcagtt gttgtttatg atatcacaaa tgtaactca 300
ttccagcaaa ctacaaagtg gattgatgat gtcagaacag aaagaggaag tgatgttacc 360
atcatgctag taggaaataa aacagatcct gctgacaaga ggcaagtgtc aattgaggag 420
ggagagagga aagccaaaga gctgaatggt atgtttattg aaactagtgc aaaagctgga 480
tacaatgtaa agcagctctt tcgacgtgta gcagcagctt tgccgggaat ggaaagcaca 540
caggacagaa gcagagaaga tatgattgac ataaaactgg aaaagcctca ggagcaacca 600
gtcagtgaag gaggctgttc ctgctaa 627

<210> 3
<211> 567
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

Met His Gly Arg Leu Lys Val Lys Thr Ser Glu Glu Gln Ala Glu Ala
1 5 10 15
Lys Arg Leu Glu Arg Glu Gln Lys Leu Lys Leu Tyr Gln Ser Ala Thr
20 25 30
Gln Ala Val Phe Gln Lys Arg Gln Ala Gly Glu Leu Asp Glu Ser Val
35 40 45
Leu Glu Leu Thr Ser Gln Ile Leu Gly Ala Asn Pro Asp Phe Ala Thr
50 55 60

Leu Trp Asn Cys Arg Arg Glu Val Leu Gln Gln Leu Glu Thr Gln Lys
65 70 75 80

Ser Pro Glu Glu Leu Ala Ala Leu Val Lys Ala Glu Leu Gly Phe Leu
85 90 95

Glu Ser Cys Leu Arg Val Asn Pro Lys Ser Tyr Gly Thr Trp His His
100 105 110

Arg Cys Trp Leu Leu Gly Arg Leu Pro Glu Pro Asn Trp Thr Arg Glu
115 120 125

Leu Glu Leu Cys Ala Arg Phe Leu Glu Val Asp Glu Arg Asn Phe His
130 135 140

Cys Trp Asp Tyr Arg Arg Phe Val Ala Thr Gln Ala Ala Val Pro Pro
145 150 155 160

Ala Glu Glu Leu Ala Phe Thr Asp Ser Leu Ile Thr Arg Asn Phe Ser
165 170 175

Asn Tyr Ser Ser Trp His Tyr Arg Ser Cys Leu Leu Pro Gln Leu His
180 185 190

Pro Gln Pro Asp Ser Gly Pro Gln Gly Arg Leu Pro Glu Asp Val Leu
195 200 205

Leu Lys Glu Leu Glu Leu Val Gln Asn Ala Phe Phe Thr Asp Pro Asn
210 215 220

Asp Gln Ser Ala Trp Phe Tyr His Arg Trp Leu Leu Gly Arg Ala Asp
225 230 235 240

Pro Gln Asp Ala Leu Arg Cys Leu His Val Ser Arg Asp Glu Ala Cys
245 250 255

Leu Thr Val Ser Phe Ser Arg Pro Leu Leu Val Gly Ser Arg Met Glu
260 265 270

Ile Leu Leu Leu Met Val Asp Asp Ser Pro Leu Ile Val Glu Trp Arg
275 280 285

Thr Pro Asp Gly Arg Asn Arg Pro Ser His Val Trp Leu Cys Asp Leu
290 295 300

Pro Ala Ala Ser Leu Asn Asp Gln Leu Pro Gln His Thr Phe Arg Val
305 310 315 320

Ile Trp Thr Ala Gly Asp Val Gln Lys Glu Cys Val Leu Leu Lys Gly
325 330 335

Arg Gln Glu Gly Trp Cys Arg Asp Ser Thr Thr Asp Glu Gln Leu Phe
340 345 350

Arg Cys Glu Leu Ser Val Glu Lys Ser Thr Val Leu Gln Ser Glu Leu
355 360 365

Glu Ser Cys Lys Glu Leu Gln Glu Leu Glu Pro Glu Asn Lys Trp Cys
370 375 380

Leu Leu Thr Ile Ile Leu Leu Met Arg Ala Leu Asp Pro Leu Leu Tyr
385 390 395 400

Glu Lys Glu Thr Leu Gln Tyr Phe Gln Thr Leu Lys Ala Val Asp Pro
405 410 415

Met Arg Ala Thr Tyr Leu Asp Asp Leu Arg Ser Lys Phe Leu Leu Glu
420 425 430

Asn Ser Val Leu Lys Met Glu Tyr Ala Glu Val Arg Val Leu His Leu
435 440 445

Ala His Lys Asp Leu Thr Val Leu Cys His Leu Glu Gln Leu Leu Leu
450 455 460

Val Thr His Leu Asp Leu Ser His Asn Arg Leu Arg Thr Leu Pro Pro
465 470 475 480

Ala Leu Ala Ala Leu Arg Cys Leu Glu Val Leu Gln Ala Ser Asp Asn
485 490 495

Ala Ile Glu Ser Leu Asp Gly Val Thr Asn Leu Pro Arg Leu Gln Glu
500 505 510

Leu Leu Leu Cys Asn Asn Arg Leu Gln Gln Pro Ala Val Leu Gln Pro
515 520 525

Leu Ala Ser Cys Pro Arg Leu Val Leu Leu Asn Leu Gln Gly Asn Pro
530 535 540

Leu Cys Gln Ala Val Gly Ile Leu Glu Gln Leu Ala Glu Leu Leu Pro
545 550 555 560

Ser Val Ser Ser Val Leu Thr
565

<210> 4
<211> 331
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Gly Thr Pro Gln Lys Asp Val Ile Ile Lys Ser Asp Ala Pro Asp
1 5 10 15
Thr Leu Leu Leu Glu Lys His Ala Asp Tyr Ile Ala Ser Tyr Gly Ser
20 25 30
Lys Lys Asp Asp Tyr Glu Tyr Cys Met Ser Glu Tyr Leu Arg Met Ser
35 40 45
Gly Ile Tyr Trp Gly Leu Thr Val Met Asp Leu Met Gly Gln Leu His
50 55 60
Arg Met Asn Arg Glu Glu Ile Leu Ala Phe Ile Lys Ser Cys Gln His
65 70 75 80
Glu Cys Gly Gly Ile Ser Ala Ser Ile Gly His Asp Pro His Leu Leu
85 90 95
Tyr Thr Leu Ser Ala Val Gln Ile Leu Thr Leu Tyr Asp Ser Ile Asn
100 105 110
Val Ile Asp Val Asn Lys Val Val Glu Tyr Val Lys Gly Leu Gln Lys
115 120 125
Glu Asp Gly Ser Phe Ala Gly Asp Ile Trp Gly Glu Ile Asp Thr Arg
130 135 140
Phe Ser Phe Cys Ala Val Ala Thr Leu Ala Leu Leu Gly Lys Leu Asp
145 150 155 160
Ala Ile Asn Val Glu Lys Ala Ile Glu Phe Val Leu Ser Cys Met Asn
165 170 175
Phe Asp Gly Gly Phe Gly Cys Arg Pro Gly Ser Glu Ser His Ala Gly
180 185 190
Gln Ile Tyr Cys Cys Thr Gly Phe Leu Ala Ile Thr Ser Gln Leu His
195 200 205
Gln Val Asn Ser Asp Leu Leu Gly Trp Trp Leu Cys Glu Arg Gln Leu
210 215 220

Pro Ser Gly Gly Leu Asn Gly Arg Pro Glu Lys Leu Pro Asp Val Cys
225 230 235 240

Tyr Ser Trp Trp Val Leu Ala Ser Leu Lys Ile Ile Gly Arg Leu His
245 250 255

Trp Ile Asp Arg Glu Lys Leu Arg Asn Phe Ile Leu Ala Cys Gln Asp
260 265 270

Glu Glu Thr Gly Gly Phe Ala Asp Arg Pro Gly Asp Met Val Asp Pro
275 280 285

Phe His Thr Leu Phe Gly Ile Ala Gly Leu Ser Leu Leu Gly Glu Glu
290 295 300

Gln Ile Lys Pro Val Asn Pro Val Phe Cys Met Pro Glu Glu Val Leu
305 310 315 320

Gln Arg Val Asn Val Gln Pro Glu Leu Val Ser
325 330

<210> 5
<211> 653
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

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

Gly Leu Pro Glu Ser Ile Ile Ala Ala Ala Cys Ser Arg Ser Gly Arg
20 25 30

Arg Val Leu His Val Asp Ser Arg Ser Tyr Tyr Gly Gly Asn Trp Ala
35 40 45

Ser Phe Ser Phe Ser Gly Leu Leu Ser Trp Leu Lys Glu Tyr Gln Glu
50 55 60

Asn Ser Asp Ile Val Ser Asp Ser Pro Val Trp Gln Asp Gln Ile Leu
65 70 75 80

Glu Asn Glu Glu Ala Ile Ala Leu Ser Arg Lys Asp Lys Thr Ile Gln
85 90 95

His Val Glu Val Phe Cys Tyr Ala Ser Gln Asp Leu His Glu Asp Val
100 105 110

Glu Glu Ala Gly Ala Leu Gln Lys Asn His Ala Leu Val Thr Ser Ala
115 120 125

Asn Ser Thr Glu Ala Ala Asp Ser Ala Phe Leu Pro Thr Glu Asp Glu
130 135 140

Ser Leu Ser Thr Met Ser Cys Glu Met Leu Thr Glu Gln Thr Pro Ser
145 150 155 160

Ser Asp Pro Glu Asn Ala Leu Glu Val Asn Gly Ala Glu Val Thr Gly
165 170 175

Glu Lys Glu Asn His Cys Asp Asp Lys Thr Cys Val Pro Ser Thr Ser
180 185 190

Ala Glu Asp Met Ser Glu Asn Val Pro Ile Ala Glu Asp Thr Thr Glu
195 200 205

Gln Pro Lys Lys Asn Arg Ile Thr Tyr Ser Gln Ile Ile Lys Glu Gly
210 215 220

Arg Arg Phe Asn Ile Asp Leu Val Ser Lys Leu Leu Tyr Ser Arg Gly
225 230 235 240

Leu Leu Ile Asp Leu Leu Ile Lys Ser Asn Val Ser Arg Tyr Ala Glu
245 250 255

Phe Lys Asn Ile Thr Arg Ile Leu Ala Phe Arg Glu Gly Arg Val Glu
260 265 270

Gln Val Pro Cys Ser Arg Ala Asp Val Phe Asn Ser Lys Gln Leu Thr
275 280 285

Met Val Glu Lys Arg Met Leu Met Lys Phe Leu Thr Phe Cys Met Glu
290 295 300

Tyr Glu Lys Tyr Pro Asp Glu Tyr Lys Gly Tyr Glu Glu Ile Thr Phe
305 310 315 320

Tyr Glu Tyr Leu Lys Thr Gln Lys Leu Thr Pro Asn Leu Gln Tyr Ile
325 330 335

Val Met His Ser Ile Ala Met Thr Ser Glu Thr Ala Ser Ser Thr Ile
340 345 350

Asp Gly Leu Lys Ala Thr Lys Asn Phe Leu His Cys Leu Gly Arg Tyr

Pro Asn Pro Glu Asp Ile Ile Leu Asp Gly Asp Ser Leu Gln Pro Glu
610 615 620

Ala Ser Glu Ser Ser Ala Ile Pro Glu Ala Asn Ser Glu Thr Phe Lys
625 630 635 640

Glu Ser Thr Asn Leu Gly Asn Leu Glu Glu Ser Ser Glu
645 650

<210> 6
<211> 1962
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 6
atggcgggata ctctcccttc ggagtttgat gtgatcgtaa tagggacggg tttgcctgaa 60
tccatcattg cagctgcatg ttcaagaagt ggccggagag ttctgcatgt tgattcaaga 120
agctactatg gaggaaactg ggccagtttt agcttttcag gactattgtc ctggctaaag 180
gaataccagg aaaacagtga cattgtaagt gacagtccag tgtggcaaga ccagatcctt 240
gaaaatgaag aagccattgc tcttagcagg aaggacaaaa ctattcaaca tgtggaagta 300
ttttgttatg ccagtcagga tttgcatgaa gatgtcgaag aagctggtgc actgcagaaa 360
aatcatgctc ttgtgacatc tgcaaaactcc acagaagtgc cagattctgc cttcctgcct 420
acggaggatg agtcattaag cactatgagc tgtgaaatgc tcacagaaca aactccaagc 480
agcgatccag agaatgctcct agaagtaaat ggtgctgaag tgacagggga aaaagaaaac 540
cattgtgatg ataaaacttg tgtgccatca acttcagcag aagacatgag tgaaaatgtg 600
cctatagcag aagataccac agagcaacca aagaaaaaca gaattactta ctacaaaatt 660
attaaagaag gcagagagatt taatattgat ttagtatcaa agctgctgta ttctcgagga 720
ttactaattg atcttctaata caaatctaata gttagtcgat atgcagagtt taaaaatatt 780
accaggattc ttgcatttcg agaaggacga gtggaacagg ttccgtgttc cagagcagat 840
gtctttaata gcaacaact tactatggta gaaaagcga tgctaataa atttcttaca 900
ttttgtatgg aatatgagaa atatcctgat gaatataaag gatatgaaga gatcacattt 960
tatgaatatt taaagactca aaaattaacc cccaacctcc aatatattgt catgcattca 1020
attgcaatga catcagagac agccagcagc accatagatg gtctcaaagc taccaaaaac 1080
tttcttcact gtcttgggcg gtatggcaac actccatttt tgtttccttt atatggccaa 1140
ggagaactcc cccagtgttt ctgcaggatg tgtgctgtgt ttggtggaat ttattgtcct 1200
cgccattcag tacagtgcct tgtagtggac aaagaatcca gaaaatgtaa agcaattata 1260
gatcagtttg gtcagagaa aatctctgag catttcctcg tggaggacag ttactttcct 1320
gagaacatgt gctcacgtgt gcaatacagg cagatctcca gggcagtgt gattacagat 1380

agatctgtcc taaaaacaga ttcagatcaa cagatttcca ttttgacagt gccagcagag 1440
gaaccaggaa cttttgctgt tcgggtcatt gagttatgtt cttcaacgat gacatgcatg 1500
aaaggcacct atttggttca tttgacttgc acatcttcta aaacagcaag agaagattta 1560
gaatcagttg tgcagaaatt gtttgttcca tatactgaaa tggagataga aaatgaacaa 1620
gtagaaaagc caagaattct gtgggctctt tacttcaata tgagagattc gtcagacatc 1680
agcaggagct gttataatga tttaccatcc aacgtttatg tctgctctgg cccagattgt 1740
ggtttaggaa atgataatgc agtcaaacag gctgaaacac ttttccagga aatctgcccc 1800
aatgaagatt tctgtcccc tccaccaaat cctgaagaca ttatccttga tggagacagt 1860
ttacagccag aggcttcaga atccagtgcc ataccagagg ctaactcgga gactttcaag 1920
gaaagcacia accttggaac cctagaggag tcctctgaat aa 1962

<210> 7
<211> 1992
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 7
gatatcgaat tcctgcagcc cggcggcacc atggcggata ctctcccttc ggagtttgat 60
gtgatcgtaa tagggacggg tttgcctgaa tccatcattg cagctgcatg ttcaagaagt 120
ggccggagag ttctgcatgt tgattcaaga agctactatg gaggaaactg ggccagtttt 180
agcttttcag gactattgtc ctggctaaag gaataccagg aaaacagtga cattgtaagt 240
gacagtccag tgtggcaaga ccagatcctt gaaaatgaag aagccattgc tcttagcagg 300
aaggacaaaa ctattcaaca tgtggaagta ttttgttatg ccagtcagga tttgcatgaa 360
gatgtcgaag aagctgggtgc actgcagaaa aatcatgctc ttgtgacatc tgcaaactcc 420
acagaagctg cagattctgc cttcctgcct acggaggatg agtcattaag cactatgagc 480
tgtgaaatgc tcacagaaca aactccaagc agcgatccag agaatgcgct agaagtaaat 540
ggtgctgaag tgacagggga aaaagaaaac cattgtgatg ataaaacttg tgtgcatca 600
acttcagcag aagacatgag tgaaaatgtg cctatagcag aagataccac agagcaacca 660
aagaaaaaca gaattactta ctcaaaaatt attaaagaag gcaggagatt taatattgat 720
ttagtataca agctgctgta ttctcgagga ttactaattg atcttctaata caaatctaata 780
gtagtgcgat atgcagagtt taaaaatatt accagattc ttgcatttcg agaaggacga 840
gtggaacagg ttccgtgttc cagagcagat gtctttaata gcaacaact tactatggta 900
gaaaagcga tgctaatgaa atttcttaca ttttgtatgg aatatgagaa atatcctgat 960
gaatataaag gatatgaaga gatcacattt tatgaatatt taaagactca aaaattaacc 1020
cccaacctcc aatatattgt catgcattca attgcaatga catcagagac agccagcagc 1080

accatagatg gtctcaaagc taccaaaaac tttcttcaact gtcttgggcg gtatggcaac 1140
actccatttt tgtttccttt atatggccaa ggagaactcc cccagtgttt ctgcaggatg 1200
tgtgctgtgt ttggtggaat ttattgtcct cgccattcag tacagtgcct tgtagtggac 1260
aaagaatcca gaaaatgtaa agcaattata gatcagtttg gtcagagaaat aatctctgag 1320
catttcctcg tggaggacag ttactttcct gagaacatgt gctcacgtgt gcaatacag 1380
cagatctcca gggcagtgct gattacagat agatctgtcc taaaaacaga ttcagatcaa 1440
cagatttcca ttttgacagt gccagcagag gaaccaggaa cttttgctgt tcgggtcatt 1500
gagttatggt cttcaacgat gacatgcatg aaaggcacct atttggttca tttgacttgc 1560
acatcttcta aaacagcaag agaagattta gaatcagttg tgcagaaatt gtttgttcca 1620
tatactgaaa tggagataga aatgaacaa gtagaaaagc caagaattct gtgggctcct 1680
tacttcaata tgagagattc gtcagacatc agcaggagct gttataatga tttaccatcc 1740
aacgtttatg tctgctctgg cccagattgt ggtttaggaa atgataatgc agtcaaacag 1800
gctgaaacac ttttccagga aatctgcccc aatgaagatt tctgtcccc tccaccaaat 1860
cctgaagaca ttatccttga tggagacagt ttacagccag aggcttcaga atccagtgcc 1920
ataccagagg ctaactcgga gactttcaag gaaagcacia accttgaaa cctagaggag 1980
tcctctgaat aa 1992

<210> 8
<211> 567
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 8

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

Lys Arg Leu Glu Arg Glu Gln Lys Leu Lys Leu Tyr Gln Ser Ala Thr
20 25 30

Gln Ala Val Phe Gln Lys Arg Gln Ala Gly Glu Leu Asp Glu Ser Val
35 40 45

Leu Glu Leu Thr Ser Gln Ile Leu Gly Ala Asn Pro Asp Phe Ala Thr
50 55 60

Leu Trp Asn Cys Arg Arg Glu Val Leu Gln His Leu Glu Thr Glu Lys
65 70 75 80

Ser Pro Glu Glu Ser Ala Ala Leu Val Lys Ala Glu Leu Gly Phe Leu
85 90 95

Glu Ser Cys Leu Arg Val Asn Pro Lys Ser Tyr Gly Thr Trp His His
100 105 110

Arg Cys Trp Leu Leu Ser Arg Leu Pro Glu Pro Asn Trp Ala Arg Glu
115 120 125

Leu Glu Leu Cys Ala Arg Phe Leu Glu Ala Asp Glu Arg Asn Phe His
130 135 140

Cys Trp Asp Tyr Arg Arg Phe Val Ala Ala Gln Ala Ala Val Ala Pro
145 150 155 160

Ala Glu Glu Leu Ala Phe Thr Asp Ser Leu Ile Thr Arg Asn Phe Ser
165 170 175

Asn Tyr Ser Ser Trp His Tyr Arg Ser Cys Leu Leu Pro Gln Leu His
180 185 190

Pro Gln Pro Asp Ser Gly Pro Gln Gly Arg Leu Pro Glu Asn Val Leu
195 200 205

Leu Lys Glu Leu Glu Leu Val Gln Asn Ala Phe Phe Thr Asp Pro Asn
210 215 220

Asp Gln Ser Ala Trp Phe Tyr His Arg Trp Leu Leu Gly Arg Ala Glu
225 230 235 240

Pro His Asp Val Leu Cys Cys Val His Val Ser Arg Glu Glu Ala Cys
245 250 255

Leu Ser Val Cys Phe Ser Arg Pro Leu Thr Val Gly Ser Arg Met Gly
260 265 270

Thr Leu Leu Leu Met Val Asp Glu Ala Pro Leu Ser Val Glu Trp Arg
275 280 285

Thr Pro Asp Gly Arg Asn Arg Pro Ser His Val Trp Leu Cys Asp Leu
290 295 300

Pro Ala Ala Ser Leu Asn Asp Gln Leu Pro Gln His Thr Phe Arg Val
305 310 315 320

Ile Trp Thr Gly Ser Asp Ser Gln Lys Glu Cys Val Leu Leu Lys Asp
325 330 335

Arg Pro Glu Cys Trp Cys Arg Asp Ser Ala Thr Asp Glu Gln Leu Phe

340 345 350

Arg Cys Glu Leu Ser Val Glu Lys Ser Thr Val Leu Gln Ser Glu Leu
355 360 365

Glu Ser Cys Lys Glu Leu Gln Glu Leu Glu Pro Glu Asn Lys Trp Cys
370 375 380

Leu Leu Thr Ile Ile Leu Leu Met Arg Ala Leu Asp Pro Leu Leu Tyr
385 390 395 400

Glu Lys Glu Thr Leu Gln Tyr Phe Ser Thr Leu Lys Ala Val Asp Pro
405 410 415

Met Arg Ala Ala Tyr Leu Asp Asp Leu Arg Ser Lys Phe Leu Leu Glu
420 425 430

Asn Ser Val Leu Lys Met Glu Tyr Ala Asp Val Arg Val Leu His Leu
435 440 445

Ala His Lys Asp Leu Thr Val Leu Cys His Leu Glu Gln Leu Leu Leu
450 455 460

Val Thr His Leu Asp Leu Ser His Asn Arg Leu Arg Ala Leu Pro Pro
465 470 475 480

Ala Leu Ala Ala Leu Arg Cys Leu Glu Val Leu Gln Ala Ser Asp Asn
485 490 495

Ala Leu Glu Asn Val Asp Gly Val Ala Asn Leu Pro Arg Leu Gln Glu
500 505 510

Leu Leu Leu Cys Asn Asn Arg Leu Gln Gln Ser Ala Ala Ile Gln Pro
515 520 525

Leu Val Ser Cys Pro Arg Leu Val Leu Leu Asn Leu Gln Gly Asn Ser
530 535 540

Leu Cys Gln Glu Glu Gly Ile Gln Glu Arg Leu Ala Glu Met Leu Pro
545 550 555 560

Ser Val Ser Ser Ile Leu Thr
565

<210> 9
<211> 331
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 9

Met Gly Thr Gln Gln Lys Asp Val Thr Ile Lys Ser Asp Ala Pro Asp
1 5 10 15

Thr Leu Leu Leu Glu Lys His Ala Asp Tyr Ile Ala Ser Tyr Gly Ser
20 25 30

Lys Lys Asp Asp Tyr Glu Tyr Cys Met Ser Glu Tyr Leu Arg Met Ser
35 40 45

Gly Val Tyr Trp Gly Leu Thr Val Met Asp Leu Met Gly Gln Leu His
50 55 60

Arg Met Asn Lys Glu Glu Ile Leu Val Phe Ile Lys Ser Cys Gln His
65 70 75 80

Glu Cys Gly Gly Val Ser Ala Ser Ile Gly His Asp Pro His Leu Leu
85 90 95

Tyr Thr Leu Ser Ala Val Gln Ile Leu Thr Leu Tyr Asp Ser Ile His
100 105 110

Val Ile Asn Val Asp Lys Val Val Ala Tyr Val Gln Ser Leu Gln Lys
115 120 125

Glu Asp Gly Ser Phe Ala Gly Asp Ile Trp Gly Glu Ile Asp Thr Arg
130 135 140

Phe Ser Phe Cys Ala Val Ala Thr Leu Ala Leu Leu Gly Lys Leu Asp
145 150 155 160

Ala Ile Asn Val Glu Lys Ala Ile Glu Phe Val Leu Ser Cys Met Asn
165 170 175

Phe Asp Gly Gly Phe Gly Cys Arg Pro Gly Ser Glu Ser His Ala Gly
180 185 190

Gln Ile Tyr Cys Cys Thr Gly Phe Leu Ala Ile Thr Ser Gln Leu His
195 200 205

Gln Val Asn Ser Asp Leu Leu Gly Trp Trp Leu Cys Glu Arg Gln Leu
210 215 220

Pro Ser Gly Gly Leu Asn Gly Arg Pro Glu Lys Leu Pro Asp Val Cys
225 230 235 240

Tyr Ser Trp Trp Val Leu Ala Ser Leu Lys Ile Ile Gly Arg Leu His
245 250 255

Trp Ile Asp Arg Glu Lys Leu Arg Ser Phe Ile Leu Ala Cys Gln Asp
260 265 270

Glu Glu Thr Gly Gly Phe Ala Asp Arg Pro Gly Asp Met Val Asp Pro
275 280 285

Phe His Thr Leu Phe Gly Ile Ala Gly Leu Ser Leu Leu Gly Glu Glu
290 295 300

Gln Ile Lys Pro Val Ser Pro Val Phe Cys Met Pro Glu Glu Val Leu
305 310 315 320

Gln Arg Val Asn Val Gln Pro Glu Leu Val Ser
325 330

RIVENDICAZIONI

1. Metodo per determinare l'attività di un vettore di terapia genica codificante la proteina Rab escort 1 (REP1) per l'uso nel trattamento della coroideremia, il metodo comprendendo i passaggi di:

(a) mettere a contatto un campione comprendente REP1 con Rab6a, Rab geranylgeranyltransferasi (Rab GGTasi) e un substrato donatore di lipidi,

in cui il campione comprendente REP1 è di una cellula geneticamente ingegnerizzata per esprimere la REP1 usando il vettore di terapia genica codificante REP1; e

(b) rivelare il prodotto Rab6a lipidato.

2. Metodo per l'analisi di controllo di qualità di un vettore di terapia genica codificante la proteina Rab escort 1 (REP1) per l'uso nel trattamento della coroideremia, il metodo comprendendo i passaggi di:

(a) mettere a contatto un campione comprendente REP1 con Rab6a, Rab geranylgeranyltransferasi (Rab GGTasi) e un substrato donatore di lipidi,

in cui il campione comprendente REP1 è di una cellula geneticamente ingegnerizzata per esprimere REP1 usando il vettore di terapia genica codificante REP1; e

(b) rivelare il prodotto Rab6a lipidato.

3. Il metodo della rivendicazione 1 o 2, in cui il campione comprendente REP1 è un lisato della cellula geneticamente ingegnerizzata per esprimere REP1 usando il vettore di terapia genica codificante REP1.

4. Il metodo di una qualsiasi delle rivendicazioni 1 – 3, in cui il vettore di terapia genica codificante REP1 è un vettore virale comprendente una sequenza nucleotidica codificante REP1, preferibilmente in cui il vettore virale è un vettore virale adeno-associato (AAV), preferibilmente in cui il vettore virale è AAV sierotipo 2 (AAV2).

5. Il metodo di qualsiasi precedente rivendicazione, in cui la sequenza nucleotidica codificante REP1 del vettore di terapia genica codificante REP1 comprende una sequenza nucleotidica che codifica una sequenza amminoacidica che ha almeno l'80% di identità con SEQ ID NO: 5, preferibilmente in cui la sequenza amminoacidica mantiene sostanzialmente la funzione naturale della proteina rappresentata da SEQ ID NO: 5.

6. Il metodo di qualsiasi precedente rivendicazione, in cui Rab6a e/o Rab GGTasi sono sostanzialmente puri.

7. Il metodo di qualsiasi precedente rivendicazione, in cui il rapporto molare Rab6a:Rab GGTasi è 1:2,3 o 1:2,5.
8. Il metodo di qualsiasi precedente rivendicazione, in cui il substrato donatore di lipidi è geranilgeranilpirofosfato (GGPP) o un suo analogo, preferibilmente biotina-geranilpirofosfato (BGPP).
9. Il metodo di qualsiasi precedente rivendicazione, in cui il prodotto Rab6a lipidato è rivelato usando un aggio immunoassorbente legato ad enzima (ELISA), analisi Western blot o autoradiografia.
10. Il metodo di qualsiasi precedente rivendicazione, in cui la rivelazione del prodotto Rab6a lipidato comprende la quantificazione della quantità del prodotto Rab6a lipidato, preferibilmente la quantificazione della quantità rispetto ad un livello di controllo o di riferimento.
11. Uso di Rab6a per determinare in vitro l'attività di un vettore di terapia genica codificante la proteina Rab escort 1 (REP1) per l'uso nel trattamento della coroideremia, in cui il Rab6a è messo a contatto con REP1 da una cellula geneticamente ingegnerizzata per esprimere REP1 usando il vettore di terapia genica codificante REP1.
12. Uso di Rab6a per l'analisi di controllo di qualità in vitro di un vettore di terapia genica codificante la proteina Rab escort 1 (REP1) per l'uso nel trattamento della coroideremia, in cui il Rab6a è messo a contatto con REP1 di una cellula geneticamente ingegnerizzata per esprimere REP1 usando il vettore di terapia genica codificante REP1.
13. L'uso della rivendicazione 11 o 12, in cui REP1 è un lisato di una cellula geneticamente ingegnerizzata per esprimere REP1 usando il vettore di terapia genica codificante REP1.
14. L'uso di una qualsiasi delle rivendicazioni 11-13, in cui il vettore di terapia genica codificante REP1 è un vettore virale comprendente una sequenza nucleotidica codificante REP1, preferibilmente in cui il vettore virale è un vettore virale adeno-associato (AAV).
15. L'uso di una qualsiasi delle rivendicazioni 11-14, in cui Rab6a è sostanzialmente puro.

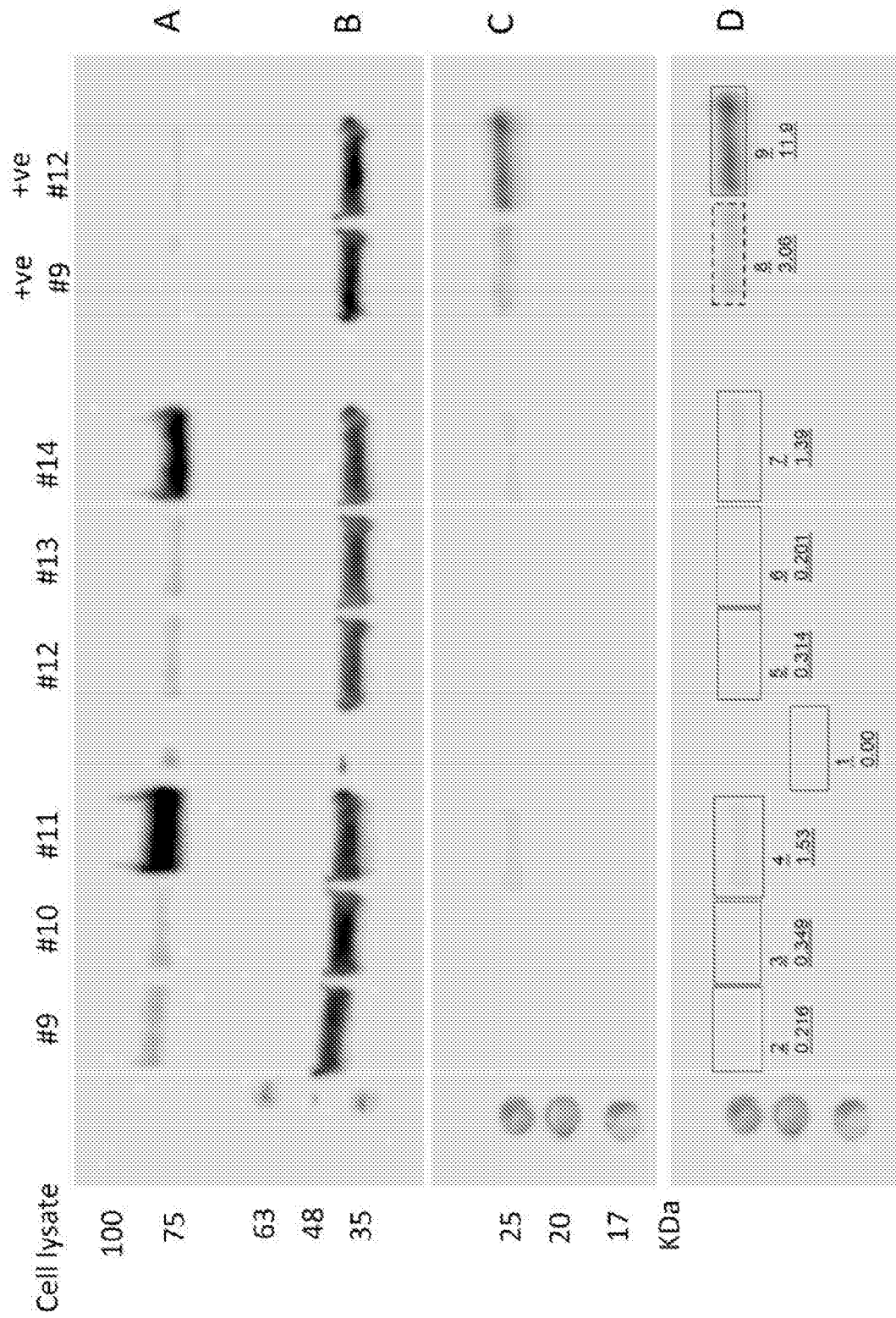


Figure 2

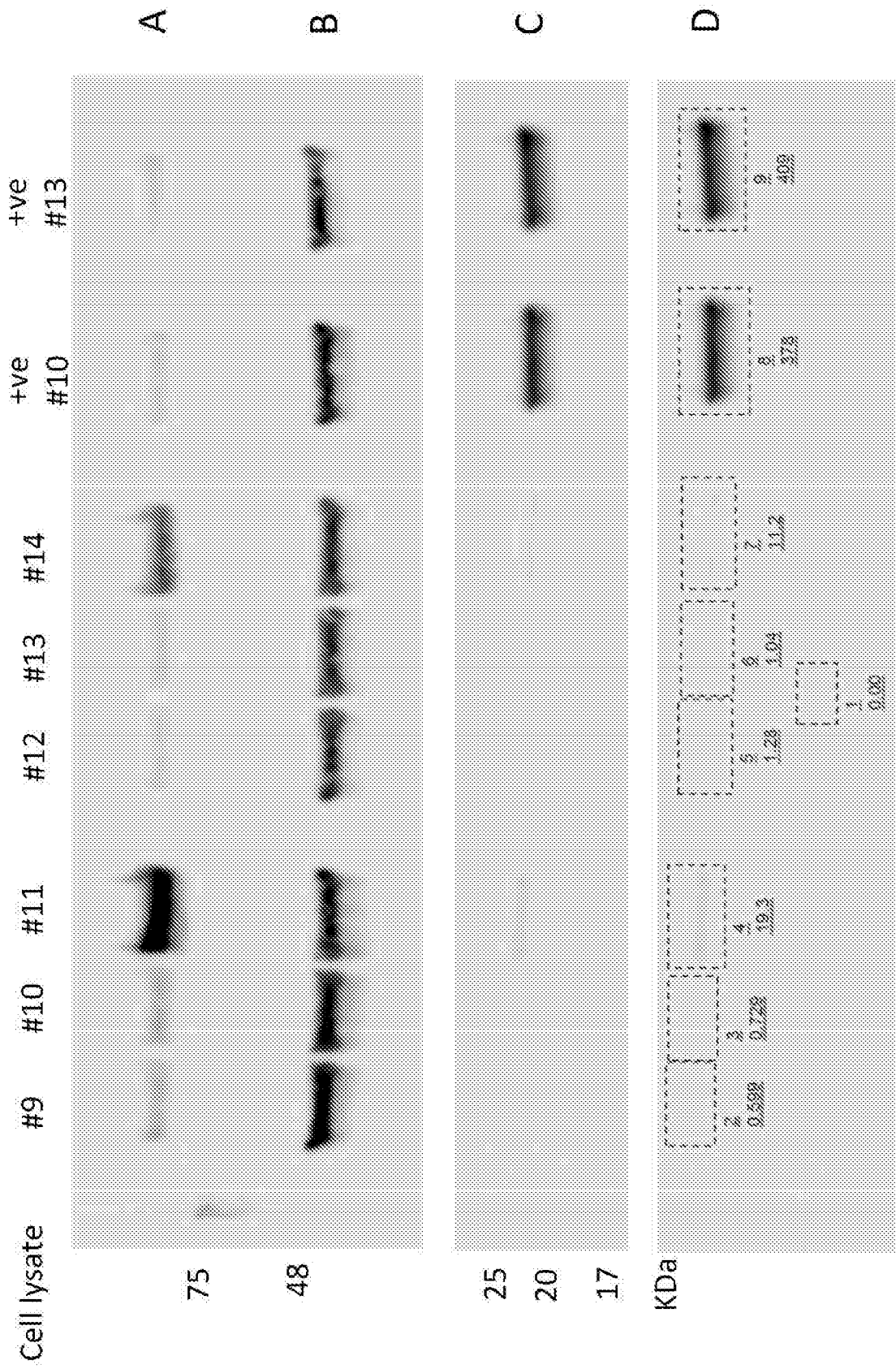


Figure 3

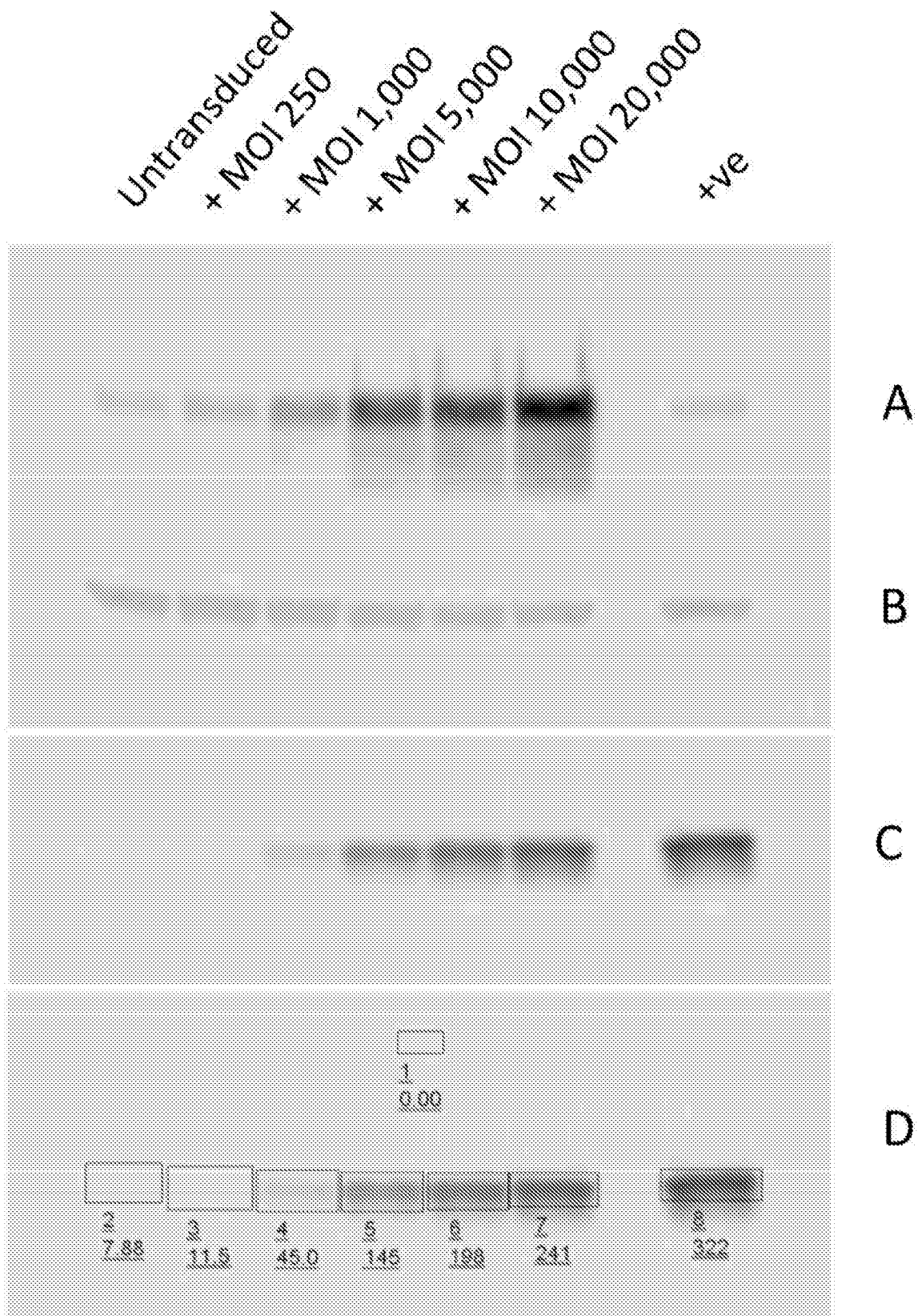


Figure 4

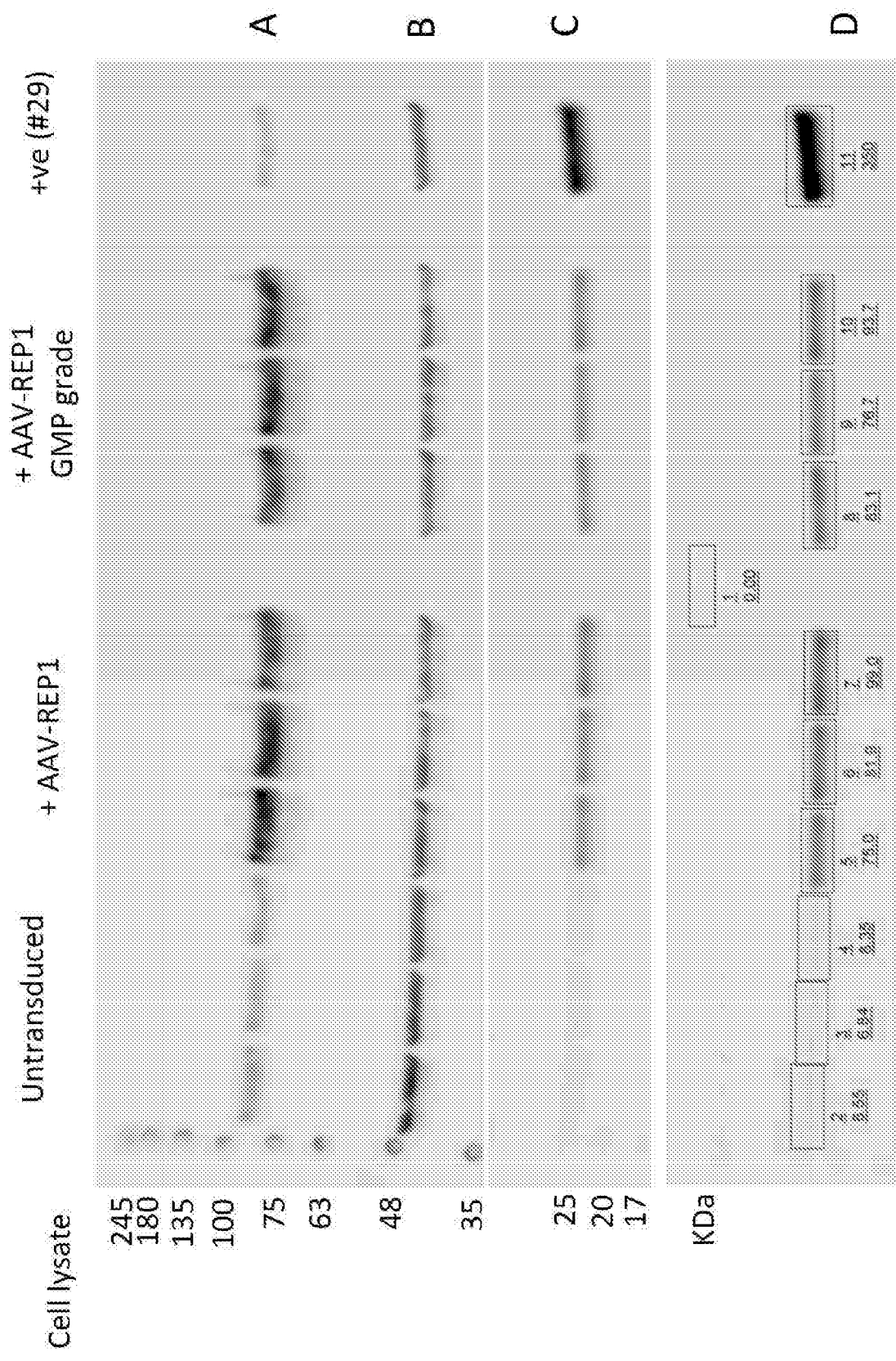


Figure 5

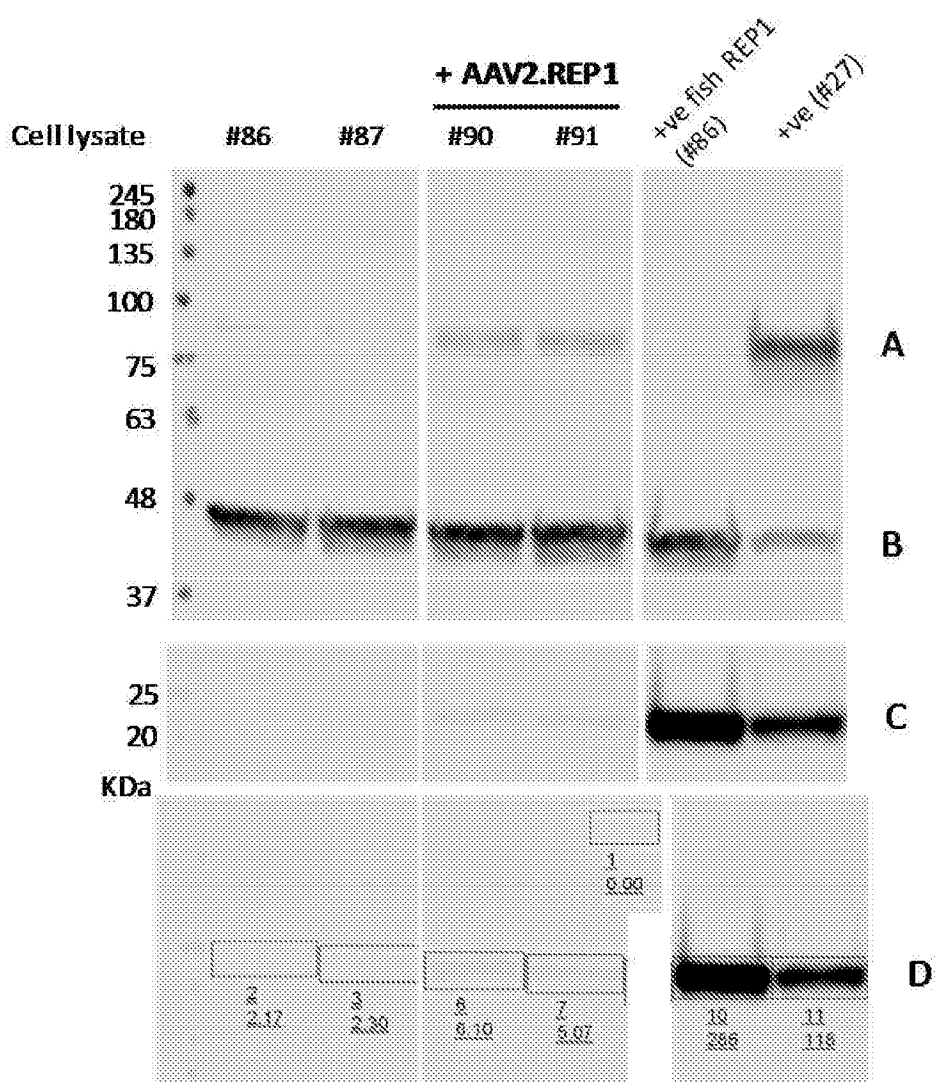


Figure 6

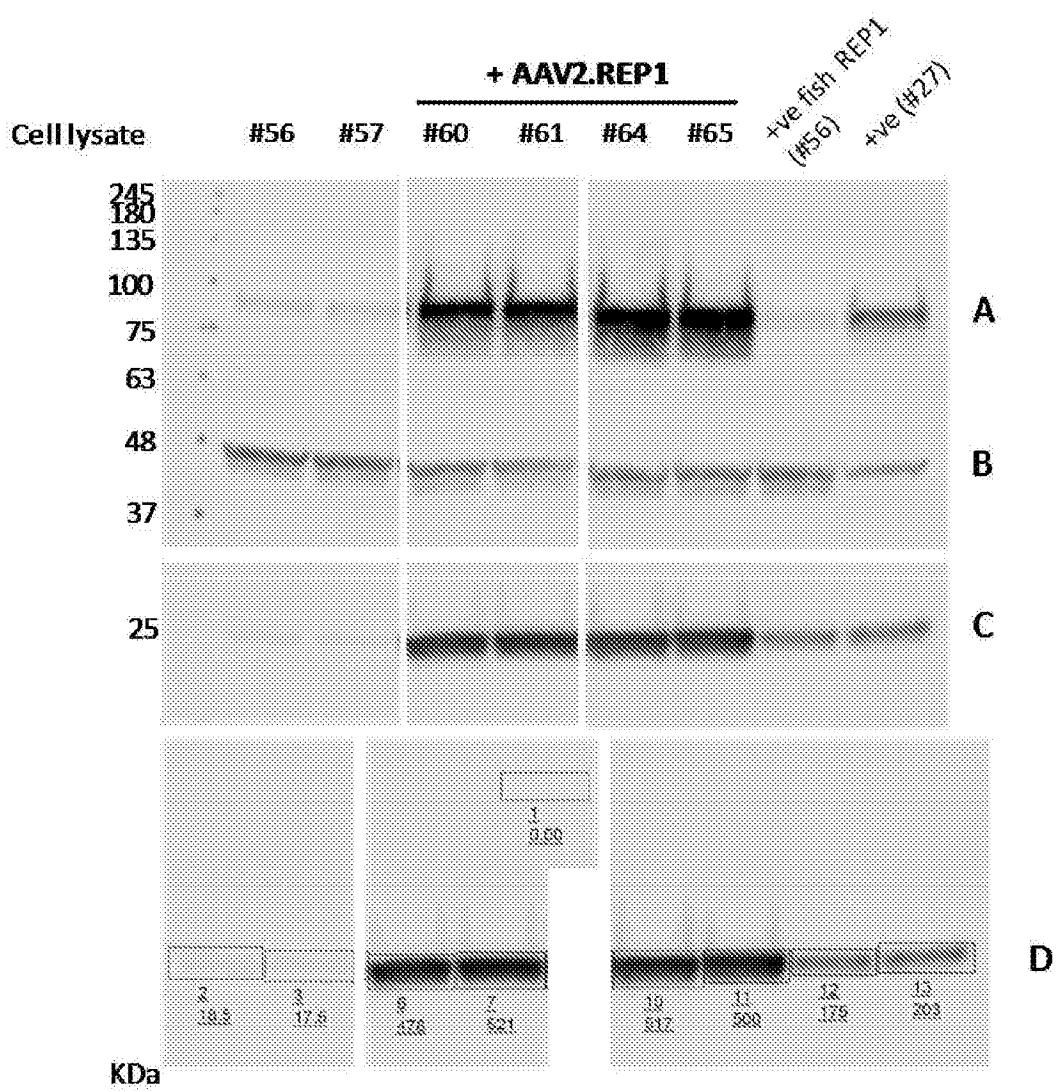
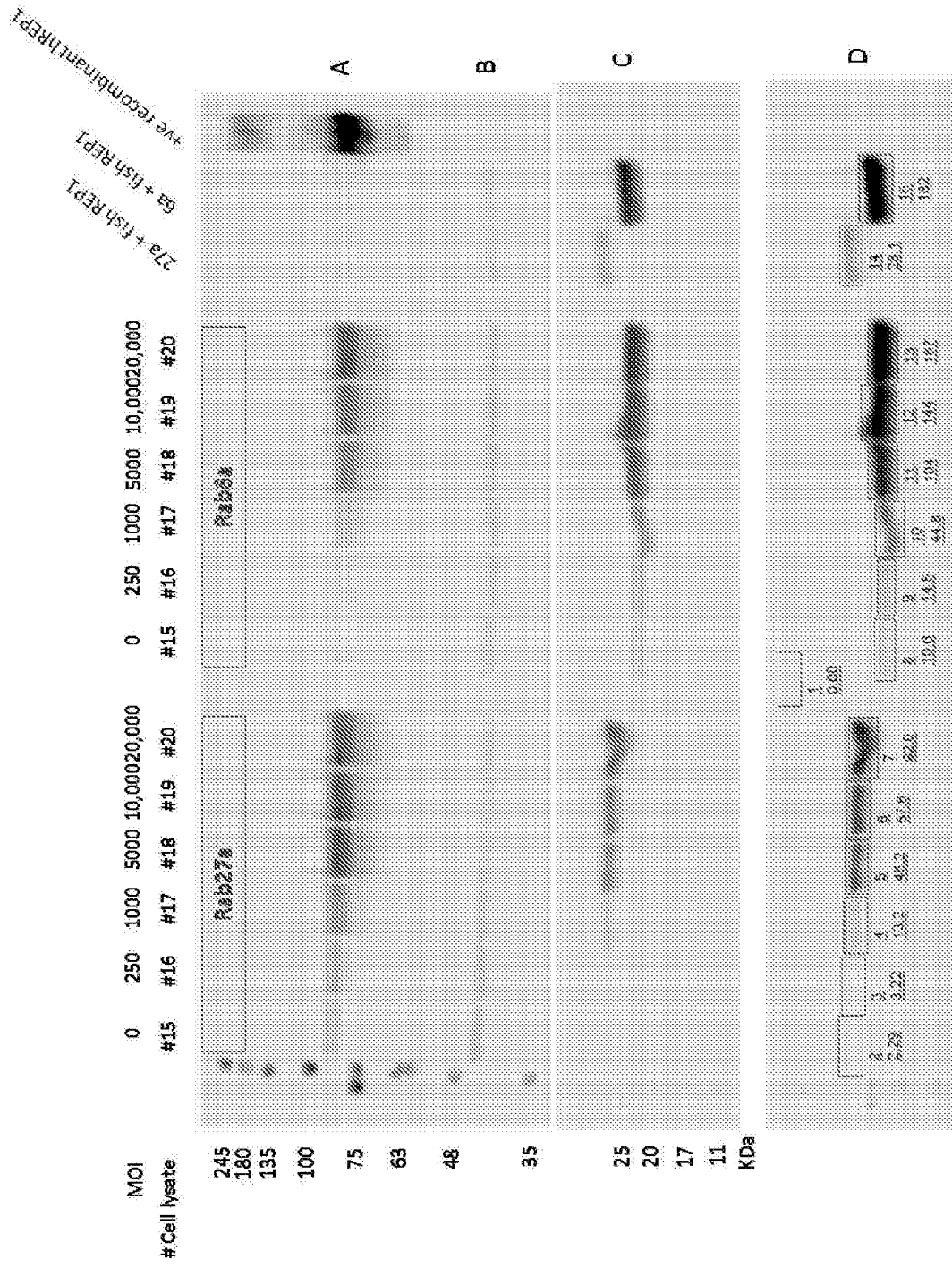


Figure 7

Figure 8(A-D)



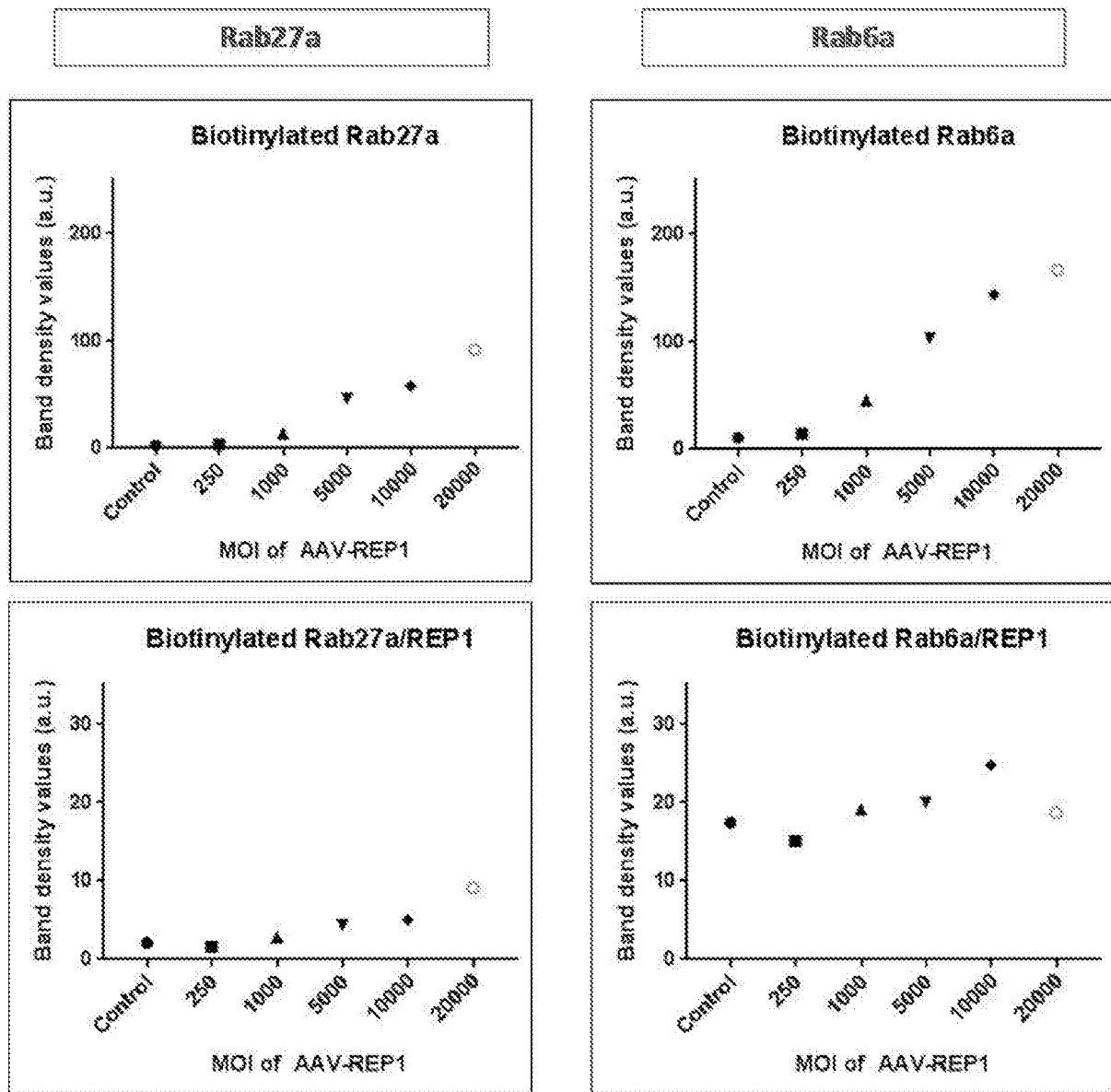


Figure 8(E)

µM	Rab27a										Rab28										+ve
	2.5	5	10	20	20	20	20	20	20	20	2.5	5	10	20	20	20	20	20	20	20	
µg Lysate	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
GGTase II	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
Rab	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	

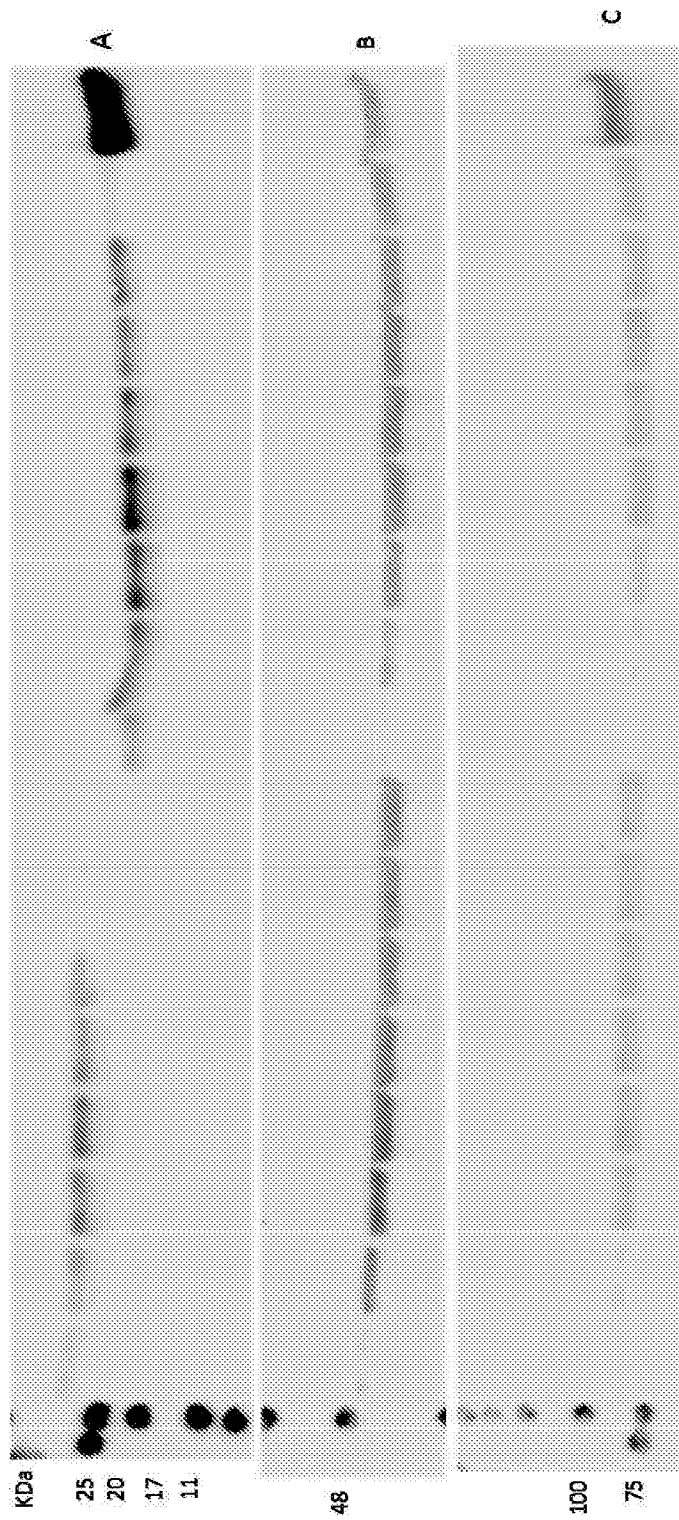


Figure 9 (A-C)

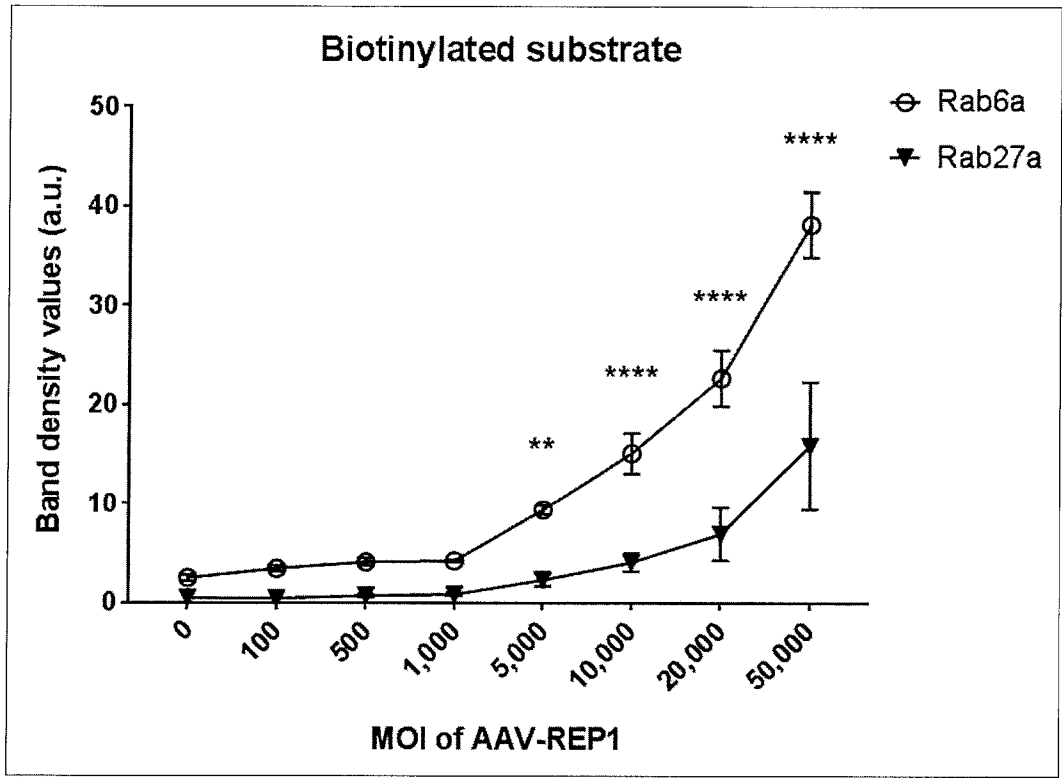


Figure 10

EX6119R - LEGENDA FIGURE

FIGURA 1	
Cell lysate	Lisato cellulare
FIGURA 2	
Cell lysate	Lisato cellulare
FIGURA 3	
Cell lysate	Lisato cellulare
FIGURA 4	
Untransduced	Non trasdotte
FIGURA 5	
Cell lysate	Lisato cellulare
Untransduced	Non trasdotte
FIGURA 6	
Cell lysate	Lisato cellulare
+ve fish REP1 (#86)	+ve REP1 di pesce (N. 86)
+ve (#27)	+ve (N. 27)
FIGURA 7	
Cell lysate	Lisato cellulare
+ve fish REP1 (#56)	+ve REP1 di pesce (N. 56)
+ve (#27)	+ve (N. 27)
FIGURA 8 (A-D)	
# Cell lysate	N. lisato cellulare
27a + fish REP1	27a + REP1 di pesce
6a + fish REP1	6a + REP1 di pesce
+ve recombinant hREP1	+ve hREP1 ricombinante
FIGURA 8 (E)	

Biotinylated Rab27a	Rab27a biotinilato
Band density values (a.u.)	Valori di densità di banda (a.u.)
Control	Controllo
Biotinylated Rab6a	Rab6a biotinilato
Band density values (a.u.)	Valori di densità di banda (a.u.)
Control	Controllo
Biotinylated Rab27a/REP1	Rab27a biotinilato/REP1
Band density values (a.u.)	Valori di densità di banda (a.u.)
Control	Controllo
Biotinylated Rab6a/REP1	Rab6a biotinilato/REP1
Band density values (a.u.)	Valori di densità di banda (a.u.)
Control	Controllo
FIGURA 9 (A-C)	
µg Lysate	Lisato µg
GGTase II	GGTasi II
FIGURA 9 (D)	
Lysate	Lisato
GGTase II	GGTasi II
Band density values (a.u.)	Valori di densità di banda (a.u.)
FIGURA 10	
Biotinylated substrate	Substrato biotinilato
Band density values (a.u.)	Valori di densità di banda (a.u.)
MOI of AAV-REP1	MOI di AAV-REP1