

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 511 740**

51 Int. Cl.:

C12N 15/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.02.2004 E 04712832 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.08.2014 EP 1599591**

54 Título: **Procedimientos de terapia génica para tratar trastornos del oído mediante la administración de un vector que codifica un factor atonal asociado**

30 Prioridad:

24.02.2003 US 373249

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

23.10.2014

73 Titular/es:

**GENVEC, INC. (100.0%)
910 Clopper Road, Suite 220N
Gaithersburg, MD 20878, US**

72 Inventor/es:

BROUGH, DOUGLAS E.

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 511 740 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimientos de terapia génica para tratar trastornos del oído mediante la administración de un vector que codifica un factor atonal asociado

Campo de la invención

5 La invención se refiere a materiales y procedimientos para alterar la percepción sensorial de un animal.

Antecedentes de la invención

10 El oído es un órgano complejo que comprende un laberinto de estructuras responsables de la audición y el equilibrio. La percepción tanto de la audición como del equilibrio reside en la capacidad de las estructuras del oído interno para transformar los estímulos mecánicos en impulsos reconocidos por el cerebro. Los receptores sensoriales responsables de la audición se localizan en la cóclea, un canal con forma de espiral lleno de fluido. Dentro de la cóclea se encuentra el órgano de Corti, que está revestido por células ciliadas sensoriales columnares que forman un puente con la membrana basilar y la membrana tectorial. A medida que la onda de sonido atraviesa el órgano de Corti, la membrana basilar vibra y hace que las células ciliadas se muevan hacia delante y hacia atrás. El movimiento despolariza la célula ciliada y conduce a la liberación de neurotransmisores en el nervio auditivo que transporta el impulso al cerebro.

15 El equilibrio y la orientación están mediados por el sistema vestibular del oído interno. El sistema vestibular comprende el utrículo y el sáculo, que detectan el movimiento lineal, y los canales semicirculares, que detectan el movimiento circular. En cada región del sistema vestibular, el movimiento de la región de la cabeza crea una alteración del fluido o pequeñas piedras de calcio en los órganos vestibulares, lo que produce el movimiento de las células ciliadas. Los impulsos nerviosos creados por el movimiento de flexión de las células ciliadas se transmiten al cerebro y de este modo proporcionan información sobre la posición del cuerpo.

20 Tanto en la audición como en el equilibrio, los estímulos mecánicos se traducen en señales neurales por acción de las células ciliadas sensoriales y daños en estas producen muchos tipos de hipoacusia y trastornos del equilibrio. Los daños mecánicos por, por ejemplo, ruidos altos, doblan las células ciliadas de la cóclea hasta el punto que la célula ciliada ya no puede translucir las señales a los nervios auditivos. Como las células ciliadas de mamíferos no se regeneran de forma natural se puede producir una pérdida de audición permanente si las células ciliadas están dañadas. Aparte de los traumatismos acústicos, que son la principal causa de alteración de la audición, la pérdida de audición también se atribuye a síndromes hereditarios, infecciones bacterianas o virales, uso de fármacos de prescripción y presbiacusia (pérdida de audición asociada con la edad). Asimismo, los trastornos del equilibrio, especialmente los trastornos vestibulares, se han debido a infecciones, lesiones cerebrales, uso de fármacos y la edad.

25 La pérdida de audición y los trastornos del equilibrio son indiscriminados entre la población mundial y se prevé que una mayoría de la población experimente alguna reducción de la capacidad auditiva durante su vida. De hecho, más de 28 millones de americanos están sordos o tienen hipoacusia (que varía desde una pequeña pérdida de sensibilidad a una pérdida completa de la audición), de los que el 80% experimenta pérdida de audición irreversible. De hecho, aproximadamente el 54% de la población de mayores de 65 años de edad vive con hipoacusia (Better Hearing Institute, 1999, publicado por la American Speech-Language-Hearing Association). Las opciones para tratar la pérdida de audición son pocas. Los tratamientos más frecuentes implican audífonos e implantes cocleares. Las opciones de tratamiento para los trastornos del equilibrio incluyen rehabilitación del equilibrio y fisioterapia. No obstante, es probable que dichas terapias sean necesarias durante periodos de tiempo prolongados si el trastorno es progresivo. En la actualidad no existe un tratamiento farmacológico eficaz probado para los trastornos que implican pérdida o daños en las células ciliadas sensoriales del oído.

35 Dada la prevalencia de los trastornos de la audición y el equilibrio y la falta de opciones terapéuticas eficientes, existe la necesidad de un procedimiento eficaz de modulación de la percepción sensorial mediada por el oído interno de un animal, que sirva como tratamiento profiláctico y terapéutico de trastornos asociados con el oído, en particular de los trastornos asociados con la destrucción o pérdida de células ciliadas sensoriales, tales como pérdida de audición y trastornos del equilibrio. De acuerdo con lo anterior, la invención proporciona materiales y procedimientos para modificar la percepción sensorial de un animal. Esta y otras ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción detallada proporcionada en el presente documento.

50 Breve resumen de la invención

La invención se refiere a un procedimiento para modificar la percepción sensorial de un animal. El procedimiento comprende administrar en el oído interno un vector de expresión (p. ej., un vector viral) que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un factor atonal asociado. La secuencia de ácido nucleico se expresa para producir el factor atonal asociado, que tiene como resultado la generación de células ciliadas que permiten la percepción de estímulos en el oído interno. Idealmente, el procedimiento trata profilácticamente o terapéuticamente un trastorno asociado con la pérdida o el daño de las células ciliadas sensoriales del oído.

Además, la invención se refiere a un procedimiento de generación de una célula ciliada en el epitelio sensorial diferenciado *in vivo*. El procedimiento comprende poner en contacto las células epiteliales sensoriales diferenciadas con un vector adenoviral (a) deficiente en una o más funciones génicas esenciales para la replicación de la región E1 y la región E4, (b) que comprende un espaciador en la región E4 y (c) que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un factor atonal asociado, en el que la secuencia de ácido nucleico se expresa para producir el factor atonal asociado de un modo tal que se genera una célula ciliada. También se proporciona un vector adenoviral que comprende un genoma adenoviral que tiene una deficiencia en al menos una función génica esencial para la replicación de la región E4 y una secuencia de ácido nucleico que codifica un factor atonal asociado.

Descripción detallada de la invención

La percepción sensorial que requiere la transformación de estímulos mecánicos en impulsos nerviosos, tales como la percepción del sonido o la posición (equilibrio), depende del funcionamiento eficiente de las células ciliadas sensoriales. En la mayoría de los mamíferos, las células ciliadas están completamente diferenciadas después del nacimiento y no se regeneran. Por tanto, los daños en las células ciliadas durante la vida de un mamífero son irreversibles (Hawkins, Adv. Oto-Rhino-Laryngol., 20.125 - 141 (1973)). Anteriormente era imposible corregir una pérdida de células ciliadas sensoriales en el oído. La invención afirma al menos en parte, sobre el sorprendente descubrimiento de que las células ciliadas sensoriales se pueden generar administrando en el epitelio sensorial una secuencia de ácido nucleico que codifica un factor de transcripción de la familia de proteínas asociadas con atonal. Un factor atonal asociado estimula la diferenciación de las células no sensoriales del epitelio sensorial, es decir células de soporte, en células ciliadas sensoriales. La capacidad para transformar una célula no sensorial del oído interno en una célula ciliada sensorial funcional representa un gran avance en la mejora de la percepción de estímulos ambientales. Sorprendentemente, los factores asociados con atonal convierten las células de soporte en células ciliadas en el epitelio sensorial diferenciado maduro. En otras palabras, el procedimiento descrito en el presente documento permite la generación de una célula ciliada a partir de una célula progenitora diferenciada, lo que implica que las células madre no son necesarias para reponer una población de células sensoriales ciliadas. La generación de células sensoriales ciliadas en el oído interno se explota para modular la percepción sensorial de un animal. Idealmente, el procedimiento descrito en el presente documento trata profilácticamente o terapéuticamente a un animal, preferentemente un mamífero (p. ej., un ser humano) para al menos un trastorno asociado con la pérdida o el daño de las células ciliadas sensoriales, por ejemplo trastornos del oído asociados con daños en las células ciliadas sensoriales (tales como pérdida de audición o trastornos del equilibrio). El procedimiento también es útil en el mantenimiento de un nivel de percepción sensorial, es decir controlar la pérdida de percepción de estímulos ambientales causados por, por ejemplo, el proceso de envejecimiento. La invención, específicamente las composiciones descritas en las reivindicaciones adjuntas, proporciona materiales para modular la percepción sensorial de un animal.

Percepción sensorial

En particular, la divulgación proporciona un procedimiento para modificar la percepción sensorial de un animal. El procedimiento comprende administrar en el oído interno un vector de expresión (p. ej., un vector de expresión viral) que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un factor atonal asociado. La secuencia de ácido nucleico se expresa para producir el factor atonal asociado, que tiene como resultado la generación de células ciliadas sensoriales que permiten la percepción (o el reconocimiento) de estímulos en el oído interno. Por "modificación de la percepción sensorial" se quiere decir conseguir, al menos en parte, la capacidad para reconocer y adaptarse a los cambios ambientales. En términos de la función de las células ciliadas sensoriales, una modificación en la percepción sensorial se asocia con la generación de células ciliadas sensoriales que convierten los estímulos mecánicos en el oído interno en impulsos neurales, que después se procesan en el cerebro de un modo tal que un animal es consciente de los cambios ambientales, por ejemplo sonidos, lenguaje o posición del cuerpo/la cabeza. Las células ciliadas sensoriales se generan, preferentemente, en el órgano de Corti y/o el aparato vestibular.

La generación de células ciliadas sensoriales se puede determinar usando varios medios, como los conocidos por los expertos en la materia. Las células ciliadas se pueden detectar mediante microscopía electrónica de barrido o mediante detección de la miosina VIIa, una proteína específica de las células ciliadas que se detecta mediante inmunohistoquímica. No obstante, la mera presencia de células ciliadas sensoriales no implica necesariamente un sistema funcional para reconocer los estímulos ambientales. Las células ciliadas sensoriales funcionales deben estar unidas operablemente a las vías neurales, de forma que los estímulos mecánicos se traducen en impulsos nerviosos reconocidos por el cerebro. De acuerdo con lo anterior, aunque la detección de la generación de células ciliadas es adecuada para determinar el éxito de la expresión de la secuencia de ácido nucleico atonal asociado en el tejido diana, el análisis del conocimiento del sujeto es un indicador mejor de los cambios en la percepción sensorial.

Un cambio en la capacidad de un sujeto para detectar sonidos se consigue fácilmente mediante la administración de sencillas pruebas de audición, tal como una prueba de tonos que normalmente realiza un otorrino. En la mayoría de los mamíferos, una reacción a frecuencias diferentes indica un cambio en la percepción sensorial. En seres humanos, la comprensión del lenguaje también es adecuada. Por ejemplo, es posible que un sujeto oiga y que no sea capaz de entender el habla. Un cambio en la percepción viene indicado por la capacidad para distinguir diferentes tipos de estímulos acústicos, tal como diferenciar el lenguaje del ruido de fondo, y entendiendo el habla.

Las pruebas del umbral del habla y de discriminación son útiles para dichas evaluaciones.

La evaluación de los cambios en el equilibrio, la percepción del movimiento y/o el tiempo de respuesta a los estímulos de movimiento también se consigue usando varias técnicas. La función vestibular también se puede medir comparando la magnitud de la respuesta a un estímulo de movimiento (ganancia) o el tiempo del inicio de la respuesta (fase). Se puede analizar a los animales para determinar la ganancia y la fase del reflejo vestibulo-ocular (RVO) usando la técnica de la bobina escleral en campo magnético para evaluar las mejoras en la percepción sensorial. La electronistagmografía (ENG) registra los movimientos oculares en respuesta a estímulos tales como, por ejemplo, luces en movimiento o intermitentes, reposicionamiento del cuerpo, movimiento de fluidos en el interior de los canales semicirculares y similares. La evaluación del equilibrio durante el movimiento usando una silla rotatoria o una plataforma móvil también es útil a este respecto.

Para detectar un cambio en la percepción sensorial, se registra un valor basal antes del procedimiento de la invención usando cualquier prueba sensorial adecuada. Un sujeto se reevalúa en un periodo de tiempo adecuado tras el procedimiento de la invención (p. ej., 1 hora, 6 horas, 12 horas, 18 horas, 1 día, 3 días, 5 días, 7 días, 14 días, 21 días, 28 días, 2 meses, 3 meses o más tras el procedimiento de la invención), cuyos resultados se comparan con los resultados basales para determinar un cambio en la percepción sensorial.

Procedimiento de tratamiento

La presente divulgación se refiere a un procedimiento que estimula la generación de células ciliadas sensoriales que permite la percepción de estímulos. Idealmente, el procedimiento trata profilácticamente o terapéuticamente un animal para al menos un trastorno asociado con la pérdida, daño, ausencia de células ciliadas sensoriales, tal como la pérdida de audición y trastornos del equilibrio. La pérdida de audición puede deberse a daños en las células ciliadas del órgano de Corti debido a una infección bacteriana o viral, herencia, lesión física, traumatismo acústico y similares. Aunque la pérdida de audición se identifica con facilidad, los trastornos del equilibrio se manifiestan con una amplia variedad de complicaciones fácilmente atribuibles a otros alimentos. Los síntomas de un trastorno del equilibrio incluyen desorientación, mareos, vértigo, náuseas, visión borrosa, torpeza y caídas frecuentes. Los trastornos del equilibrio tratados con el procedimiento de la invención implican, preferentemente, un trastorno vestibular periférico (es decir, una alteración en el aparato vestibular) que implica una traducción disfuncional de estímulos mecánicos en impulsos nerviosos debido a los daños o a la falta de células ciliadas sensoriales.

Por "profiláctico" se quiere decir la protección, total o parcial, frente a un trastorno asociado con células ciliadas disfuncionales (o ausencia de las mismas), en particular pérdida de audición o un trastorno del equilibrio). Por "terapéutico" se quiere decir la mejora del trastorno y, deseablemente, la protección, total o parcial, frente a la progresión adicional de la enfermedad, por ejemplo pérdida de audición progresiva. Un experto en la técnica apreciará que cualquier grado de protección, o mejora, de un trastorno, tal como pérdida de audición o alteración del equilibrio, es beneficioso para un paciente.

El procedimiento es útil en el tratamiento de trastornos progresivos tanto agudos como persistentes asociados con la falta o los daños de las células ciliadas sensoriales funcionales. Para las enfermedades agudas, un vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un factor atonal asociado (o cualquier factor de diferenciación de las células ciliadas) se puede administrar usando una sencilla aplicación o múltiples aplicaciones en un corto periodo de tiempo. Para las enfermedades persistentes, como la pérdida de audición, o trastornos procedentes de una pérdida masiva de células ciliadas sensoriales pueden ser necesarias numerosas rondas de administración del vector de expresión para ejercer un efecto terapéutico.

Vectores de expresión

Un experto en la materia apreciará que cualquiera de una serie de vectores de expresión conocidos en la técnica es adecuado para introducir una secuencia de ácido nucleico en el oído interno. Ejemplos de vectores de expresión adecuados incluyen, por ejemplo, plásmidos, complejos plásmido-liposoma y vectores virales, por ejemplo vectores de parvovirus (es decir, vectores basados en virus adenoasociados (AAV)), vectores retrovirales, vectores basados en el virus del herpes simple (HSV), vectores quiméricos adenovirales-AAV y vectores basados en adenovirus. Cualquiera de estos vectores de expresión se pueden preparar usando técnicas de ADN recombinante estándar descritas en, por ejemplo, Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989), y Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, New York, N.Y. (1994).

Los plásmidos, moléculas de ADN bicatenarias circulares modificadas genéticamente, se pueden diseñar para que contengan un casete de expresión para la liberación de una secuencia de ácido nucleico en el oído interno. Aunque los plásmidos fueron el primer vector descrito para la administración de ácidos nucleicos terapéuticos, el nivel de eficiencia de la transfección es malo en comparación con otras técnicas. Formando complejos del plásmido con liposomas, la eficiencia de la transferencia génica mejora en general. Aunque los liposomas usados para las estrategias de transferencia génica mediada por plásmidos tienen varias composiciones, normalmente son lípidos catiónicos sintéticos. Las ventajas de los complejos plásmido-liposoma incluyen su capacidad para transferir grandes porciones de ADN que codifica un ácido nucleico terapéutico y su inmunogenicidad relativamente baja. Los

plásmidos también se pueden modificar para prolongar la expresión del transgén, como se describe en la patente de EE.UU. 6.165.754. Se ha descrito la expresión de un transgén en el oído usando plásmidos (véase, por ejemplo, Jero et al., *Human Gene Therapy*, 12, 539 - 549 (2001)). Aunque los plásmidos son adecuados para usar en el procedimiento de la invención, preferentemente el vector de expresión es un vector viral.

5 Los vectores de AAV son vectores virales de particular interés para usar en los protocolos de terapia génica. El AAV es un virus ADN que no se conoce que cause enfermedad en seres humanos. El AAV requiere coinfección con un virus herpes (es decir, un adenovirus o un virus herpes) o la expresión de genes colaboradores, para una replicación eficiente. Los vectores AAV usados para la administración de un ácido nucleico terapéutico tienen aproximadamente un 96% del genoma parental eliminado, de forma que solo quedan las repeticiones terminales (ITR), que contienen señales de reconocimiento para la replicación y empaquetamiento del ADN. Esto elimina los efectos inmunológicos o tóxicos debido a la expresión de genes virales. Las células huésped que comprenden un genoma de AAV integrado no muestran cambios en el crecimiento o morfología celular (Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 4.797.368). Aunque eficiente, la necesidad de virus colaboradores o genes colaboradores puede ser un obstáculo para uso extendido de este vector.

15 Los retrovirus son virus ARN capaces de infectar una amplia variedad de células huésped. Tras la infección, el genoma del retrovirus se integra en el genoma de su célula huésped y se replica junto con el ADN de la célula huésped, de modo que están produciendo constantemente ARN viral y cualquier secuencia de ácido nucleico incorporada en el genoma del retrovirus. Al emplear retrovirus patogénicos, por ejemplo el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o virus linfotróficos de linfocitos T humanos (HTLV), se debe tomar la precaución de alterar el genoma viral para eliminar la toxicidad. Un vector retroviral puede manipularse adicionalmente para hacer que la replicación del virus sea incompetente. Como tales, se piensa que los vectores retrovirales son particularmente útiles para la transferencia génica estable *in vivo*. Los vectores lentivirales, como los vectores basados en el VIH, son ejemplos de vectores retrovirales usados para la liberación génica. Al contrario que otros retrovirus se sabe que los vectores basados en el VIH incorporan sus genes pasajeros en células que no están en división y, por tanto, son particularmente útiles en el epitelio sensorial del oído interno, en el que las células sensoriales no se regeneran.

Los vectores virales basados en el VIH son adecuados para usar como un vector de expresión para introducir ácidos nucleicos en el oído interno para la transducción de células diana. El virión del HSV maduro consiste en una cápside icosaédrica cubierta que tiene un genoma viral que consiste en una molécula de ADN bicatenario lineal que tiene 152 kb. La mayoría de los vectores de HSV con replicación deficiente contiene una delección para eliminar uno o más genes intermedios-tempranos para prevenir la replicación. Las ventajas de los vectores de herpes son su capacidad para entrar en un estado latente que puede dar lugar a la expresión de ADN a largo plazo y su gran genoma de ADN viral que puede acomodar el ADN exógeno hasta 25 kb. Por supuesto, esta capacidad también es una desventaja en términos de regímenes de tratamiento a corto plazo. Para una descripción de vectores basados en HSV adecuados para usar en los procedimientos de la invención, véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. 5.837.532, 5.846.782, 5.849.572 y 5.804.413, y las solicitudes de patente internacional WO 91/02788, WO 96/04394, WO 98/15637 y WO 99/06583.

El Adenovirus (Ad) es un virus de ADN bicatenario de 36 kb que transfiere con eficiencia ADN *in vivo* a varios tipos celulares diana diferentes. Para usar en el procedimiento de la invención, el virus se convierte, preferentemente, en deficiente en cuanto a la replicación delecionando determinados genes necesarios para la replicación viral. La región E3 no esencial para la replicación y prescindible también se suele delecionar para proporcionar espacio adicional para un inserto de ADN más grande. El vector se puede producir en títulos elevados y puede transferir con eficiencia ADN a células en replicación y no replicantes. La información genética transferida a una célula mediante un vector adenoviral permanece epicromosómica, de modo que se eliminan los riesgos de mutagénesis por inserción aleatoria y la alteración permanente del genotipo de la célula diana. No obstante, si se desea, las propiedades de integración del AAV se pueden conferir a los adenovirus construyendo un vector quimérico de AAV-Ad. Por ejemplo, las ITR del AAV y el ácido nucleico que codifica la proteína Rep incorporada en un vector adenoviral permite que el vector adenoviral se integre en un genoma de células de mamífero. Por tanto, los vectores quiméricos de AAV-Ad son una interesante opción para usar en el contexto de la invención.

50 Preferentemente, el vector de expresión del procedimiento de la invención es un vector viral; más preferentemente, el vector de expresión es un vector adenoviral. Los adenovirus de cualquier origen, subtipo, mezcla de subtipos o cualquier adenovirus quimérico se pueden usar como fuente del genoma viral para el vector adenoviral de la invención. Un adenovirus humano se usa, preferentemente, como fuente del genoma viral para el vector adenoviral defectuoso en cuanto a la replicación. El adenovirus puede ser de cualquier subgrupo o serotipo. Por ejemplo, un adenovirus puede ser un subgrupo A (p. ej., los serotipos 12, 18 y 31), subgrupo B (p. ej., los serotipos 3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35 y 50), subgrupo C (p. ej., los serotipos 1, 2, 5, y 6), subgrupo D (p. ej., serotipos 8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22 - 30, 32, 33, 36 - 39 y 42 - 48), subgrupo E (p. ej., serotipo 4), subgrupo F (p. ej., los serotipos 40 y 41) un serogrupo sin clasificar (p. ej., los serotipos 49 y 51), o cualquier otro serotipo adenoviral. Los serotipos adenovirales 1 a 51 están disponibles en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, Manassas, VA). Preferentemente, el vector adenoviral es del subgrupo C, especialmente serotipo 2 o, incluso más deseablemente, serotipo 5.

No obstante, los adenovirus que no pertenecen al grupo C, e incluso los adenovirus no humanos, se pueden usar

para preparar vectores de transferencia génica adenovirales defectuosos en la replicación para la liberación del ADN a las células diana en el oído interno. Los adenovirus preferidos usados en la construcción de vectores de transferencia génica adenovirales no pertenecientes al grupo C incluyen Ad12 (grupo A), Ad7 y Ad35 (grupo B), Ad30 y Ad36 (grupo D), Ad4 (grupo E), y Ad41 (grupo F). Los vectores adenovirales no pertenecientes al grupo C, procedimientos de producción de vectores adenovirales no pertenecientes al grupo C y procedimientos de uso de vectores adenovirales no pertenecientes al grupo C se divulgan en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. 5.801.030, 5.837.511 y 5.849.561, y las solicitudes de patente internacional WO 97/12986 y WO 98/53087. Adenovirus no humanos preferidos incluyen, entre otros, adenovirus de simios (p. ej., SAV25), bovinos, caninos, porcinos.

El vector adenoviral es, preferentemente, defectuoso en la replicación. Por “defectuoso en cuanto a la replicación” se quiere decir que en vector adenoviral comprende un genoma adenoviral que carece de al menos una función génica esencial para la replicación (Es decir, de forma que el vector adenoviral no se replica en las células huésped típicas, especialmente en las del paciente humano que podría estar infectado por el vector adenoviral durante el curso del tratamiento de acuerdo con la invención). Una deficiencia en un gen, función génica, o gen o región genómica, como se usa en el presente documento, se define como una delección de suficiente material genético del genoma viral para alterar u obstruir la función del gen cuya secuencia de ácido nucleico se delecionó total o parcialmente. Mientras que la delección del material genético se prefiere, la mutación del material genético mediante adición o sustitución también es adecuada para alterar la función génica. Las funciones génicas esenciales para la replicación son las funciones génicas que se requieren para la replicación (p. ej., propagación) y están codificadas por, por ejemplo, las regiones tempranas del adenovirus (p. ej., las regiones E1, E2, y E4), las regiones tardías (p. ej., las regiones L1-L5), los genes implicados en el empaquetamiento viral (p. ej., el gen I_{Va}2) y los ARN asociados con el virus (p. ej., VA-RNA1 y/o VA-RNA-2). Más preferentemente, el vector adenoviral defectuoso en cuanto a la replicación comprende un genoma adenoviral defectuoso en al menos una función génica esencial para la replicación de una o más regiones del genoma adenoviral. Preferentemente, el vector adenoviral es defectuoso en al menos una función génica de la región E1 o de la región E4 del genoma adenoviral necesario para la replicación viral (denominando un vector adenoviral deficiente en E1 o un vector adenoviral deficiente en E4). Además de una deficiencia en la región E1, los adenovirus recombinantes también pueden tener una mutación en el promotor tardío principal (MLP), como se trata en la solicitud de patente internacional WO 00/00628. Lo más preferentemente, el vector adenoviral es defectuoso en al menos una función génica esencial para la replicación (deseablemente, todas las funciones génicas esenciales para la replicación) de la región E1 y al menos parte de la región E3 no esencial (p. ej., una delección con Xba I de la región E3) (denominado vector adenoviral defectuoso en E1/E3). Con respecto a la región E1, el vector adenoviral puede ser defectuoso en toda o parte de la región E1A y todo o parte de la región E1B, por ejemplo en al menos una función génica esenciales para la replicación de cada una de las regiones E1A y E1B, Cuando el vector adenoviral es defectuoso en al menos una función génica esencial para la replicación en una región del genoma adenoviral (p. ej., un vector adenoviral defectuoso en E1- o E1/E3), el vector adenoviral se denomina “defectuoso en la replicación individualmente”.

El vector adenoviral de la invención puede ser “defectuoso en la replicación múltiple”, lo que significa que el vector adenoviral es defectuoso en una o más funciones génicas esenciales para la replicación en cada una de dos o más regiones del genoma adenoviral. Por ejemplo, el vector adenoviral defectuoso en E1 o defectuoso en E1/E3 mencionado anteriormente puede ser defectuoso en al menos una función génica esencial para la replicación de la región E4 (indicada como vector adenoviral defectuoso en E1/E4- o E1/E3/E4) y/o la región E2 (indicada como vector adenoviral defectuoso en E1/E2- o E1/E2/E3), preferentemente la región E2A (indicada como vector adenoviral defectuoso en E1/E2A- o E1/E2A/E3). Idealmente, el vector adenoviral carece de funciones génicas esenciales para la replicación de únicamente las funciones génicas esenciales para la replicación codificadas por las regiones tempranas del genoma adenoviral, aunque no es necesario en todos los contextos de la invención. Un vector adenoviral defectuoso múltiple preferido comprende un genoma adenoviral que tiene delecciones de los nucleótidos 457 - 3332 de la región E1, los nucleótidos 28593 - 30470 de la región E3, los nucleótidos 32826 - 35561 de la región E4 y, opcionalmente, los nucleótidos 10594 - 10595 de la región que codifica VA-RNA1. No obstante, otras delecciones pueden ser adecuadas. Los nucleótidos 356 - 3329 o 356 - 3510 se pueden eliminar para crear una deficiencia en las funciones génicas de E1 esenciales para la replicación. Los nucleótidos 28594 - 30469 se pueden delecionar de la región E3 del genoma adenoviral. Aunque las designaciones de nucleótidos específicos citados anteriormente corresponden al genoma de serotipo 5 adenoviral, los expertos en la técnica pueden determinar fácilmente los nucleótidos correspondientes para genomas adenovirales no pertenecientes al serotipo 5.

El vector adenoviral, cuando es defectuoso en la replicación múltiple, especialmente en las funciones génicas esenciales para la replicación de las regiones E1 y E4, incluye, preferentemente, un elemento espaciador para proporcionar crecimiento viral en una línea celular complementaria similar al obtenido con vectores adenovirales defectuosos en la replicación individualmente, en particular un vector adenoviral defectuoso en E1. El elemento espaciador puede contener cualquier secuencia o secuencias que tienen una longitud deseada, tal como secuencias de al menos 15 pares de bases (p. ej., entre 15 pares e bases y aproximadamente 12.000 pares de bases), preferentemente de aproximadamente 100 pares de bases a aproximadamente 10.000 pares de bases, más preferentemente de aproximadamente 500 pares de bases a aproximadamente 8.000 pares de bases, incluso más preferentemente de aproximadamente 1.500 pares de bases a aproximadamente 6.000 pares de bases, y, lo más preferentemente, de aproximadamente 2.000 pares de bases a aproximadamente 3.000 pares de bases de longitud. La secuencia del elemento espaciador puede ser codificante o no codificante y nativa o no nativa con respecto al

- genoma adenoviral, pero no restaura la función esencial para la replicación de la región defectuosa. El uso de un espaciador en un vector adenoviral se describe en la patente de EE.UU. 5.851.806. En una realización del procedimiento de la invención, el vector adenoviral defectuoso en la replicación o de replicación condicionada es un vector adenoviral defectuoso en E1/E4, en el que la región de fibra L5 se retiene y un espaciador se localiza entre la
- 5 región de fibra L5 y la ITR del lado derecho. Más preferentemente, en dicho vector adenoviral, la secuencia de poliadenilación de E4 sola o, lo más preferentemente, en combinación con otra secuencia, existe entre la región de la fibra L5 y la ITR del lado derecho para separar suficientemente la región de la fibra L5 retenida de la ITR del lado derecho, de forma que la producción viral de dicho vector se acerca a la del vector adenoviral defectuoso en la replicación individualmente, en particular un vector adenoviral defectuoso en E1.
- 10 El vector adenoviral puede ser defectuoso en las funciones génicas esenciales para la replicación de únicamente las regiones tempranas del genoma adenoviral, solo las regiones tardías del genoma adenoviral y tanto las regiones tempranas como las tardías del genoma adenoviral. El vector adenoviral también puede tener esencialmente todo el genoma adenoviral eliminado, en cuyo caso se prefiere dejar intactos las repeticiones terminales invertidas (ITR)
- 15 virales y uno o más promotores de las ITR virales y una señal de empaquetamiento (es decir, un amplicón adenoviral). Las regiones 5' o 3' del genoma adenoviral que comprende ITR y la secuencia de empaquetamiento no tienen que originarse del mismo serotipo adenoviral que el resto del genoma viral. Por ejemplo, la región en 5' de un genoma adenoviral del serotipo 5 (es decir, la región del genoma 5' a la región E1 adenoviral) se puede sustituir con la correspondiente región de un genoma adenoviral del serotipo 2 (p. ej., la región del genoma Ad5 5' de la región E1 del genoma adenoviral está sustituido por los nucleótidos 1 - 456 del genoma Ad2). Los vectores adenovirales defectuosos en la replicación adecuados, incluyendo los vectores adenovirales defectuosos en la replicación
- 20 múltiple, se divulgan en las patentes de EE.UU. 5.837.511, 5.851.806, y 5.994.106, las solicitudes de patente de EE.UU. publicadas 2001/0043922 A1 2002/0004040 A1, 2002/0031831 A1, y 2002/0110545 A1, y las solicitudes de patente internacional WO 95/34671, WO 97/12986, and WO 97/21826. Idealmente, el vector adenoviral defectuoso en la replicación está presente en una composición farmacéutica prácticamente libre de contaminación por adenovirus de replicación competente (RCA) (p. ej., la composición farmacéutica comprende menos de aproximadamente 1% de contaminación con RCA) Más deseablemente, la composición farmacéutica carece de RCA. Las composiciones de vectores adenovirales y reservas que carecen de RCA se describen en las patentes de EE.UU. 5.944.106 and 6.482.616, la solicitud de patente publicada de EE.UU. 2002/0110545 A1 y la solicitud de patente internacional WO 95/34671.
- 25 Por tanto, en una realización preferida, el vector de expresión del procedimiento de la invención es un vector adenoviral defectuoso en la replicación múltiple que carece de toda o parte de la región E1, toda o parte de la región E3, toda o parte de la región E4 y, opcionalmente, toda o parte de la región E2. Se cree que los vectores defectuosos múltiples son particularmente adecuados para la liberación de secuencias de ácido nucleico exógeno en el oído. Los vectores adenovirales defectuosos en al menos una función génica esencial para la replicación de la
- 30 región E1 se usan con más frecuencia para la transferencia génica *in vivo*. No obstante, los vectores adenovirales defectuosos en la replicación individualmente usados actualmente pueden ser perjudiciales para las células sensibles del epitelio del oído interno, lo que produce daños en las células que se van a tratar. Los vectores adenovirales defectuosos en al menos una función génica esencial para la replicación de la región E4, en particular vectores adenovirales defectuosos en funciones génicas esenciales para la replicación de la región E4 y de la de la
- 35 región E1, son menos tóxicos para las células que los vectores adenovirales defectuosos en E1 (véase, por ejemplo, Wang et al., Nature Medicine, 2(6), 714 - 716 (1996) y la patente de EE.UU. 6.228.646). De acuerdo con lo anterior, los daños a las células ciliadas y células de soporte existentes se pueden minimizar usando un vector adenoviral defectuoso en E1, E4 para liberar la secuencia de ácido nucleico que codifica el factor atonal asociado en las células del oído interno.
- 40 A este respecto, se ha observado que al menos un vector adenoviral defectuoso en E4 expresa un transgén a niveles elevados durante una cantidad limitada de tiempo *in vivo* y que la persistencia de la expresión de un transgén en al menos un vector adenoviral defectuoso en E4 se puede modular a través de la acción de un factor de acción trans, tal como HSV ICP0, Ad pTP, CMV-IE2, CMV-IE86, HIV tat, HTLV-tax, HBV-X, AAV Rep 78, el factor celular de la línea celular de osteosarcoma U205 que funciona como HSV ICP0, o el factor celular en las células PC 12 inducido por el factor de crecimiento nervioso, entre otros. A la luz de lo anterior, el vector adenoviral defectuoso múltiple (p. ej., el vector adenoviral defectuoso en al menos E4) o un segundo vector de expresión comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un factor de acción trans que modula la persistencia de la expresión de la
- 45 secuencia de ácido nucleico que codifica el factor asociado atonal, como se describe en, por ejemplo, la patente de EE.UU. 6.225.113, 6.660.521, y 6.649.373 y la solicitud de patente internacional WO 00/34496.
- 50 Los vectores adenovirales defectuosos en la replicación normalmente se producen en líneas celulares complementarias que proporcionan funciones génicas no presentes en los vectores adenovirales defectuosos en la replicación pero necesarias para la propagación viral, a niveles adecuados con el fin de generar los títulos elevados de la reserva del vector viral. Una línea celular preferida complementa al menos una, y preferentemente todas, las funciones génicas esenciales para la replicación no presentes en un adenovirus deficiente en la replicación. La línea celular preferida complementaria puede complementar una deficiencia en al menos una función génicas esencial para la replicación codificada por las regiones tempranas, las regiones tardías, las regiones de empaquetamiento viral, las regiones de ARN asociados a virus o combinaciones de los mismos, incluyendo todas las funciones adenovirales (p. ej., para permitir la propagación de amplicones adenovirales). Lo más preferentemente, la línea
- 55
- 60

celular complementaria complementa una deficiencia en al menos una función génicas esencial para la replicación (p. ej., dos o más funciones génicas esenciales para la replicación) de la región E1 del genoma adenoviral, en particular una deficiencia en una función génicas esencial para la replicación de cada una de las regiones E1A y E1B. Además, la línea celular complementaria puede complementar una deficiencia en al menos una función

5 génicas esencial para la replicación de las regiones E2 (en particular en lo que se refiere a la ADN polimerasa adenoviral y la proteína terminal) y/o E4 del genoma adenoviral. Deseablemente, una célula que complementa una deficiencia en la región E4 comprende la secuencia génica de E4-ORF6 y produce la proteína E4-ORF6. Dicha célula comprende, deseablemente, al menos ORF6 y ningún otro ORF de la región E4 del genoma adenoviral. La línea celular se caracteriza adicionalmente, preferentemente, porque contiene los genes complementarios de un

10 modo no solapante con el vector adenoviral, lo que minimiza, y prácticamente elimina, la posibilidad de que el genoma del vector se recombine con el ADN celular. De acuerdo con lo anterior, la presencia de adenovirus de replicación competente (RCA) se minimiza, si no se evita, en la reserva del vector, que, por tanto, es adecuado para determinados fines terapéuticos, especialmente para fines de terapia génica. La falta de RCA en la reserva del vector evita la replicación del vector adenoviral en células no complementarias. La construcción de dichas líneas

15 celulares complementarias implica técnicas de biología molecular y de cultivo celular estándar, como las descritas en Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2ª edición, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989), y Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, New York, N.Y. (1994).

Las líneas celulares complementarias para producir el vector adenoviral incluyen, entre otros, células 293 (descritas en, por ejemplo, Graham et al., *J. Gen. Virol.*, 36, 59 - 72 (1977)), células PER.C6 (descritas en, por ejemplo, la solicitud de patente internacional WO 97/00326, y las patentes de EE.UU. 5.994.128 y 6.033.908), y células 293-ORF6 (descritas en, por ejemplo, la solicitud de patente internacional WO 95/34671 y Brough et al., *J. Virol.*, 71, 9206 - 9213 (1997)). En algunos casos, la célula complementaria no complementará todas las funciones génicas adenovirales requeridas. Los herpes virus se pueden usar para proporcionar las funciones génicas en trans que no

20 están codificadas por los genomas adenovirales o celulares para permitir la replicación del vector adenoviral. Los vectores adenovirales se pueden construir, propagar y/o purificar usando los materiales y procedimientos expuestos en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. 5.965.358, 5.994.128, 6.033.908, 6.168.941, 6.329.200, 6.383.795, 6.440.728, 6.447.995, y 6.475.757, la publicación de solicitud de patente de EE.UU. Nº 2002/0034735 A1, y las solicitudes de patentes internacionales WO 98/53087, WO 98/56937, WO 99/15686, WO 99/54441, WO 00/12765,

25 WO 01/77304, y WO 02/29388, así como las otras referencias identificadas en el presente documento. Los vectores adenovirales no pertenecientes al grupo C, incluidos los vectores adenovirales del serotipo 35, se pueden producir usando los procedimientos expuestos en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. 5.837.511 y 5.849.561, y las solicitudes de patente internacional WO 97/12986 y WO 98/53087. Además, comercialmente existen numerosos vectores adenovirales.

La proteína de la cubierta del vector adenoviral se puede modificar para disminuir la capacidad o incapacidad del vector adenoviral para ser reconocido por un anticuerpo neutralizante dirigido contra la proteína de la cubierta silvestre. Dichas modificaciones son útiles para múltiples rondas de administración. De un modo similar, la proteína de la cubierta del vector adenoviral se puede manipular para alterar la especificidad de unión o el reconocimiento del vector adenoviral por un receptor viral sobre una posible célula huésped. Dichas manipulaciones pueden incluir

35 delección o sustitución de regiones de la fibra, pentón, hexón, pIIIa, pVI, y/o pIX, inserciones de varios ligandos nativos o no nativos en porciones de la proteína de la cubierta y similares. La manipulación de la proteína de la cubierta puede ampliar la gama de células infectadas por el vector adenoviral o permitir dirigir el vector adenoviral a un tipo de célula específico. La capacidad de un vector adenoviral para reconocer una posible célula huésped se puede modular sin manipulación genética de la proteína de la cubierta, es decir mediante el uso de una molécula

40 biespecífica. Por ejemplo, la formación de complejos de un adenovirus con una molécula biespecífica que comprende un dominio de unión de la base del pentón o de la fibra y un dominio que se une selectivamente a un sitio de unión específico de la superficie celular permite dirigir el vector adenoviral a un tipo de célula concreto.

Preferentemente, la cápside adenoviral se modifica para mostrar una secuencia de aminoácidos no nativa. La secuencia de aminoácidos no nativa se puede insertar en o en lugar de una secuencia de la proteína de la cubierta interna (p- ej., dentro de un bucle expuesto de una proteína de la fibra adenoviral) o se puede condensar en el extremo de una proteína de la cubierta adenoviral (p. ej., condensar al extremo C de una proteína de la fibra adenoviral, usando opcionalmente una secuencia ligadora o espaciadora). La secuencia de aminoácidos no nativa se puede conjugar con cualquiera de las proteínas de la cubierta adenoviral para formar una proteína de la cubierta

45 quimérica. Por tanto, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos no nativa de la invención se puede conjugar, insertar o unir a una proteína de la fibra, una proteína básica del pentón, una proteína hexón, las proteínas IX, VI, o IIIa, etc. Las secuencias de dichas proteínas, y los procedimientos para usarlas en proteínas recombinantes, son bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. 5.543.328; 5.559.099; 5.712.136; 5.731.190; 5.756.086; 5.770.442; 5.846.782; 5.962.311; 5.965.541; 5.846.782; 6.057.155; 6.127.525; 6.153.435; 6.329.190; 6.455.314; 6.465.253; Y 6.576.456; las publicaciones de solicitud de Patente de EE.UU. 2001/0047081 y

50 2003/0099619; y las solicitudes de patente internacional WO 96/07734, WO 96/26281, WO 97/20051, WO 98/07877, WO 98/07865, WO 98/40509, WO 98/54346, WO 00/15823, WO 01/58940 y WO 01/92549). La porción de la proteína de la cubierta de la proteína de la cubierta quimérica puede ser una proteína de la cubierta adenoviral de longitud completa a la que se une el dominio del ligando o se puede truncar, por ejemplo internamente o en el

60

extremo C y/o N. La porción de la proteína de la cubierta no necesita ser nativa del vector adenoviral.

5 Cuando el ligando está unido a la proteína de la fibra, preferentemente no rompe la interacción entre las proteínas virales o los monómeros de la fibra. Por tanto, la secuencia de aminoácidos no nativa no es, preferentemente, en sí misma un dominio de oligomerización, ya que este puede interaccionar de forma adversa con el dominio de trimerización de la fibra de adenovirus. Preferentemente se añade el ligando a la proteína virión y se incorpora de un modo tal que esté expuesto fácilmente al sustrato (p. ej., en el extremo N o C de la proteína, unido a un residuo que está de cara al sustrato, colocado en un espaciador peptídico para contactar el sustrato etc.) para presentar el máximo de la secuencia de aminoácidos no nativa al sustrato. Idealmente, la secuencia de aminoácidos no nativa se incorpora en una proteína de fibra adenoviral en el extremo C de la proteína de la fibra (y se une a través de un espaciador) o se incorpora en el bucle expuesto (p. ej., el bucle HI) de la fibra para crear una proteína de la cubierta quimérica. Cuando la secuencia de aminoácidos no nativa se une o sustituye a una porción de la base pentón, preferentemente está dentro de las regiones hipervariables para garantizar que entra en contacto con el sustrato. Cuando la secuencia de aminoácidos no nativa está unida al hexón, preferentemente está dentro de una región hipervariable (Mikszta et al., *J. Virol.*, 70(3), 1836 - 44 (1996)). El uso de una secuencia espaciadora para extender la secuencia de aminoácidos no nativa lejos de la superficie de la partícula adenoviral puede ser ventajoso en cuanto a que la secuencia de aminoácidos no nativa puede estar más disponible para su unión a un receptor y se reduce cualquier interacción estérica entre la secuencia de aminoácidos no nativa y los monómeros de fibra adenoviral.

20 Una proteína de la cubierta del virus quimérico que comprende un ligando no nativo es, deseablemente, capaz de entrar directamente en las células del vector viral, por ejemplo adenoviral, que comprende la proteína de la cubierta que es más eficiente que la entrada en las células de un vector que es idéntico a excepción de para comprender una proteína de la cubierta del virus silvestre en lugar de la proteína de la cubierta viral quimérica. Preferentemente, la proteína de la cubierta viral quimérica se une a un nuevo sitio de unión endógeno sobre la superficie celular que no se reconoce, o se reconoce mal, por un vector que comprende una proteína de la cubierta silvestre.

25 Además, las proteínas de la cápside adenoviral se pueden alterar para reducir o anular la unión a los receptores adenovirales nativos (es decir, receptores unidos por adenovirus silvestres). En particular, la porción de la proteína de la fibra adenoviral que interacciona con el receptor de coxsackie y adenovirus (CAR) se puede mutar mediante delección, sustitución, recolocación dentro de la proteína de la fibra etc, tal como la proteína de la fibra adenoviral no se une a CAR. Asimismo, la porción de la proteína pentón adenoviral que interacciona con las integrinas se puede alterar para anular la unión de la integrina nativa. Para reducir la unión nativa y la transducción del vector adenoviral defectuoso en la replicación o con replicación condicionada, los sitios de unión nativos localizados en las proteínas de la cubierta adenoviral que median en la entrada de, por ejemplo, la base de la fibra y/o del pentón, están ausentes o rotos. Se cree que dos o más de las proteínas de la cubierta adenoviral participan en la unión a las superficies celulares (p. ej., la fibra y la base de pentón. Se puede usar cualquier técnica adecuada para alterar la unión nativa a una célula huésped (p. ej., una célula del mesotelio o un hepatocito. Por ejemplo, explotar las diferentes longitudes de la fibra para anular la unión nativa a las células e puede conseguir mediante la adición de una secuencia de unión a la base pentón o al pomo de la fibra. Esta adición se puede realizar directa o indirectamente mediante una secuencia de unión biespecífica o multiespecífica. Como alternativa, la proteína de la fibra adenoviral se puede modificar para reducir el número de aminoácidos en el eje de la fibra, de modo que se crea una fibra de "eje más corto" (como se describe en, por ejemplo, la patente de EE.UU. 5.962.311). Las proteínas de la fibra de algunos serotipos adenoviral son de origen más cortos que otros y estas proteínas de la fibra se pueden usar en lugar de la proteína de la fibra nativa para reducir la unión nativa del adenovirus a su receptor nativo. Por ejemplo, la proteína de la fibra de nativa de un vector adenoviral derivado del adenovirus de serotipo 5 se puede cambiar con la proteína de la fibra de los adenovirus de serotipos 40 o 41.

45 A este respecto, el vector adenoviral se puede modificar para incluir una proteína de la cubierta adenoviral (p. ej., proteína de la fibra, pentón o hexón) de un serotipo diferente de adenovirus. Por ejemplo, un adenovirus de serotipo adenoviral 5 se puede modificar para que muestra una fibra de adenovirus de serotipo 35, que, a su vez, puede comprender, opcionalmente, uno o más ligandos de aminoácidos no nativos. Es posible usar un vector adenoviral que no infecte de forma natural los tipos celulares del oído interno para dirigir el vector a un tipo de célula concreto. Como alternativa, un vector adenoviral que transluce de forma natural las células del oído interno se pueden modificar para mostrar una proteína de la fibra adenoviral y/o una base de pentón adenoviral derivada de un adenovirus que no tiene un tropismo natural para las células diana, en las que el vector adenovirus puede mostrar una secuencia de aminoácidos no nativa que permite la transducción de las células diana.

55 En otra realización, los residuos de ácido nucleico asociados con la unión al sustrato nativo se pueden mutar (véase, por ejemplo, la solicitud de patente internacional WO 00/15823; Einfeld et al., *J. Virol.*, 75(23), 11284 - 11291 (2001); y van Beusechem et al., *J. Virol.*, 76(6), 2753 - 2762 (2002)) de forma tal que el vector adenoviral que incorpora los residuos de ácido nucleico es menos capaz de unirse a su sustrato nativo. Por ejemplo, los serotipos 2 y 5 de los adenovirus transducen las células a través de la unión de la proteína de fibra adenoviral a receptores de virus coxsackie y adenovirus (CAR) y la unión de proteínas pentón a las integrinas localizadas en la superficie celular. De acuerdo con lo anterior, el vector adenoviral defectuoso en la replicación o con replicación condicionada del procedimiento de la invención puede carecer de la unión nativa a CAR y/o exhibir una menor unión de la nativa a las integrinas. Para reducir la unión nativa del vector adenoviral defectuoso en la replicación o con replicación condicionada para las células huésped, los sitios de unión a integrina y/o CAR (en cuyo caso, las secuencias de

RGD localizadas en el pentón base adenoviral.

Las modificaciones de las proteínas de la cubierta adenoviral pueden potenciar la capada de los vectores adenovirales resultantes para evadir el sistema inmunológico del huésped. En una realización, el vector adenoviral se dirige de forma selectiva a las células epiteliales cicatrizadas (p. ej., regiones del epitelio en las que faltan células ciliadas funcionales endógenas) mediante la anulación de la unión nativa del vector adenoviral a CAR y/o integrinas y la incorporación en la cápside adenoviral de uno o más ligandos no nativos. Los ligandos adecuados que participan en la transducción a través de un receptor específico se pueden determinar usando técnicas de expresión de bibliotecas de rutina (tales como expresión en fagos) e incluyen, por ejemplo, ligandos unidos por EGF y ligandos de la familia de péptidos FGF. Otros ejemplos de secuencias de aminoácidos no nativas y sus sustratos incluyen, entre otros, tiras lineales y cortas (p. ej., 6 aminoácidos o menos) de aminoácidos reconocidos por las integrinas, así como secuencias de poliaminoácidos tales como polilisina, poliarginina etc. Las secuencias de aminoácidos no nativas para generar proteínas de la cubierta adenoviral quimérica se describen adicionalmente en la patente de EE.UU. 6.455.314 y la solicitud de patente internacional WO 01/92549.

Modificaciones adecuadas de un vector adenoviral se describen en las patentes de EE.UU. 5.543.328, 5.559.099, 5.712.136, 5.731.190, 5.756.086, 5.770.442, 5.846.782, 5.871.727, 5.885.808, 5.922.315, 5.962.311, 5.965.541, 6.057.155, 6.127.525, 6.153.435, 6.329.190, 6.455.314, and 6.465.253, las solicitudes publicadas de EE.UU. 2001/0047081 A1, 2002/0099024 A1, y 2002/0151027 A1, y las solicitudes de patente internacional WO 96/07734, WO 96/26281, WO 97/20051, WO 98/07865, WO 98/07877, WO 98/40509, WO 98/54346, WO 00/15823, WO 01/58940, y WO 01/92549. La construcción de vectores adenovirales se conoce bien en la técnica. Los vectores adenovirales se pueden construir y/o purificar usando los procedimientos expuestos en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. 5.965.358, 6.168.941, 6.329.200, 6.383.795, 6.440.728, 6.447.995, y 6.475.757, y las solicitudes de patente internacional WO 98/53087, WO 98/56937, WO 99/15686, WO 99/54441, WO 00/12765, WO 01/77304, y WO 02/29388, así como las otras referencias identificadas en el presente documento. Adicionalmente, numerosos vectores de expresión, incluyendo vectores adenovirales, están disponibles comercialmente. Los vectores virales adenoasociados se pueden construir y/o purificar usando los procedimientos expuestos en, por ejemplo, la patente de EE.UU. 4.797.368 y Laughlin et al., Gene, 23, 65 - 73 (1983).

La selección de un vector de expresión para usar en el procedimiento descrito en el presente documento depende de varios factores tales como, por ejemplo, el huésped, la inmunogeneicidad del vector, la duración deseada de la producción de proteínas, la célula diana y similares. Como cada tipo de vector de expresión tiene propiedades distintas, el procedimiento de la invención se puede adaptar a cualquier situación concreta. Adicionalmente, se puede usar más de un tipo de vector de expresión para liberar la secuencia de ácido nucleico en la célula diana. La invención se refiere a un procedimiento de cambiar la percepción sensorial de un animal en el que el procedimiento comprende administrar en el oído interno al menos dos vectores de expresión diferentes, comprendiendo cada uno una secuencia de ácido nucleico que codifica un factor atonal asociado y/o una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos otro agente terapéutico, tal como un agente neurotrófico. Preferentemente, la célula diana en el oído interno, por ejemplo una célula de soporte, se pone en contacto con un vector adenoviral y un vector de HSV, y los vectores adenovirales transluen con eficiencia las células de soporte y los vectores de HSV transluen eficientemente las neuronas. Un experto en la técnica apreciará la capacidad de capitalizar sobre las propiedades ventajosas de múltiples sistemas de liberación para tratar o estudiar los trastornos sensoriales del oído interno.

Secuencia de ácido nucleico que codifica un factor atonal asociado

El vector de expresión del procedimiento descrito en el presente documento comprende un ácido nucleico que codifica un factor atonal asociado. Los factores asociados con atonal son una familia de factores de transcripción que transdiferencian las células de soporte en las células ciliadas sensoriales en el oído. Los factores asociados con atonal son factores de transcripción de la familia de proteínas de hélice-bucle-hélice (bHLH). El dominio básico de la proteína es responsable de la unión al ADN y la función de la proteína. La proteína bHLH de *Drosophila* (*ato*) activa genes asociados con el desarrollo de órganos sensoriales del insecto, específicamente los órganos cordotoniales. Se encuentran factores asociados con atonal en diversos animales e insectos, incluyendo ratones (homólogo 1 del atonal de ratón (*Math1*)), pollos (homólogo 1 del atonal de pollo (*Cath1*)), *Xenopus* (homólogo 1 del atonal de *Xenopus* (*Xath1*)), y seres humanos (homólogo 1 del atonal de ser humano (*Hath1*)). *Math1* es altamente homólogo del *ato* en el dominio bHLH (similitud de aminoácidos del 82%) con un 100% de conservación del dominio básico y funciona en la determinación del destino de la célula en ratones. Se ha demostrado que *Math1* es esencial para el desarrollo de células ciliadas y puede estimular la regeneración de las células ciliadas en el oído. *Math1* también se caracteriza en, por ejemplo, Ben-Arie et al., Human Molecular Genetic, 5, 1207 - 1216 (1996), Birmingham et al., Science, 284, 1837 - 1841 (1999), Zheng and Gao, Nature Neuroscience, 3(2), 580 - 586 (2000), Chen et al., Development, 129, 2495 - 2505 (2002). *Hath1* es el homólogo humano de *Math1*. De acuerdo con lo anterior, un factor atonal asociado es un péptido que estimula la diferenciación de las células de soporte en células ciliadas sensoriales y comprende un aminoácido que tiene una secuencia significativamente similar a la de *Math1* y *Hath1*. Los factores asociados con atonal se describen adicionalmente en la solicitud de patente internacional WO 00/73764, el listado de secuencias se incorpora en el presente documento por referencia (véase el documento WO 00/73764 en la página 28, línea 12, hasta la página 29, línea 13). Deseablemente, el factor atonal asociado es *Math1* o *Hath1*.

Por tanto, el factor atonal asociado codificado por la secuencia de ácido nucleico de la invención es, deseablemente, una proteína o péptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 50% con la secuencia de aminoácidos de Math1 (SEC ID N° 1 y 2, y número de registro en GenBank BAA07791, N° GI 994771), y que tiene la capacidad para transdiferenciar las células de soporte en células ciliadas sensoriales. Idealmente, existe una homología de al menos aproximadamente un 60% (p. ej., al menos aproximadamente un 65%, o al menos aproximadamente un 70% de identidad de secuencia), preferentemente una identidad de secuencia de al menos aproximadamente un 75% (p. ej., una identidad de secuencia de al menos aproximadamente un 80%, o de al menos aproximadamente un 85%), y, lo más preferentemente, una identidad de secuencia de al menos aproximadamente un 90% (p. ej., una identidad de secuencia de al menos aproximadamente un 95%) en comparación con la secuencia de aminoácidos de Math1. Las secuencias de aminoácidos de Math1 and Hath1 son significativamente similares y, como tales, el factor atonal asociado puede comprender una identidad de secuencia de al menos aproximadamente un 50% (p. ej., una identidad de secuencia de al menos aproximadamente un 60%, al menos aproximadamente un 65%, al menos aproximadamente un 70%, al menos aproximadamente un 75%, al menos aproximadamente un 80%, al menos aproximadamente un 85%, al menos aproximadamente un 90%, o al menos aproximadamente un 95%) con la secuencia de aminoácidos de Hath1 (SEC ID N° 3 y 4, y número de registro en GenBank AAB41305,1 N° GI 1575355, y divulgado en el documento WO 00/73764) y que tiene la capacidad para transdiferenciar las células de soporte en células ciliadas sensoriales. En cuanto a la secuencia de ácido nucleico, preferentemente la secuencia de ácido nucleico que codifica un factor atonal asociado es la secuencia de codificación del gen *Math1* o el gen *Hath1* (es decir, la porción de los genes *Math1* o *Hath1* que codifican las proteínas *Math1* o *Hath1* sin las secuencias reguladoras asociadas con el gen) o el ADNc que codifica la proteína *Math1* o *Hath1*. Las secuencias de ácido nucleico que codifican *Math1* y *Hath1* se proporcionan en el presente documento como las SEC ID N° 6 y 7 y están disponibles para el público como los números de acceso en GenBank D43694 (N° GI 994770) y U61148 (N° GI 1575354).

Aunque la secuencia de ácido nucleico que codifica el factor atonal asociado es, preferentemente, la descrita en la solicitud de patente internacional WO 00/73764, son posibles muchas modificaciones y variaciones (p. ej., mutaciones) de la secuencia de ácido nucleico y adecuadas en el contexto de la invención. Por ejemplo, la degeneración del código genético permite la sustitución de nucleótidos a lo largo de la secuencia de codificación, así como en la señal de terminación de la traducción, sin alterar el polipéptido codificado. Dichas secuencias sustituibles se pueden deducir a partir de la secuencia de aminoácidos conocida de un factor atonal asociado o la secuencia de ácido nucleico que codifica un factor atonal asociado y se puede construir mediante procedimientos sintéticos convencionales o de mutagénesis específica de sitio. Los procedimientos de síntesis de ADN se pueden llevar a cabo de acuerdo sustancialmente con los procedimientos de Itakura et al., *Science*, 198, 1056 - 1063 (1977), and Crea et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 5765 - 5769 (1978). Los procedimientos de de mutagénesis específica de sitio se describen en Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY (2d ed. 1989). Como alternativa, la secuencia de ácido nucleico puede codificar un péptido atonal asociado con extensiones en el extremo N o C de la proteína, siempre que el factor atonal asociado resultante retenga la actividad (es decir, la capacidad para transdiferenciar las células de soporte en células ciliadas sensoriales).

Se cree que la función de los factores asociados con atonal depende de la porción de hélice-bucle-hélice (HLH) de la proteína, en particular la región básica del dominio HLH (Chien et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93, 13239 - 13244 (1996)). De acuerdo con lo anterior, cualquier modificación de la secuencia de aminoácidos del factor atonal asociado se localiza deseablemente fuera del dominio básico de la proteína de un modo tal que la secuencia de aminoácidos del dominio básico tiene una identidad de secuencia de al menos aproximadamente un 50% (p. ej., una identidad de secuencia de al menos aproximadamente un 55%, al menos aproximadamente un 60% o al menos aproximadamente un 65%) con el dominio HLH de la secuencia de aminoácidos de Hath1. Preferentemente, el factor ahocicado con atonal o mutante o fragmento del mismo tiene una identidad de secuencia de al menos aproximadamente un 75%, más preferentemente una identidad de secuencia de al menos aproximadamente un 85%, incluso más preferentemente una identidad de secuencia de al menos aproximadamente un 90% (p. ej., una identidad de secuencia de al menos aproximadamente un 95%) con el dominio HLH de la secuencia de aminoácidos de Hath1. También deseablemente, cualquier modificación de la secuencia de aminoácidos del factor atonal asociado se localiza deseablemente fuera del dominio básico de la proteína, de modo que la secuencia de aminoácidos del dominio ácido tiene una identidad de secuencia de al menos aproximadamente un 50 (p. ej., una identidad de secuencia de al menos aproximadamente un 55%, de al menos aproximadamente un 60%, o de al menos aproximadamente un 65%), preferentemente una identidad de secuencia de al menos aproximadamente un 70% (p. ej., una identidad de secuencia de al menos aproximadamente un 75%, al menos aproximadamente un 80% o al menos aproximadamente un 85%), más preferentemente una identidad de secuencia de al menos aproximadamente un 90% (p. ej., una identidad de secuencia de al menos aproximadamente un 95% y, preferentemente una identidad de secuencia del 100%) con el dominio de la secuencia de aminoácidos de Hath1. También preferentemente, la secuencia de aminoácidos del factor atonal asociado comprende una región que tiene al menos aproximadamente una identidad del 75% (p. ej., una identidad de al menos aproximadamente un 80%, una identidad de al menos aproximadamente un 85%, una identidad de al menos aproximadamente un 90% o una identidad de al menos aproximadamente un 95%) con AANARERRRMHGLNHAFDQLR (SEC ID N° 5) que comprende la región básica del factor atonal asociado y la primera región hélice del motivo hélice-bucle-hélice (Jarman et al., *Cell*, 79, 1307 - 1321 (1993)).

El vector de expresión, por ejemplo el vector viral (preferentemente el vector viral adenoviral o adenoasociado) también puede comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica un fragmento terapéutico de un factor atonal asociado. Un experto en la técnica apreciará que cualquier factor de transcripción, por ejemplo Math1 o Hath1, se puede modificar o trincar y retener la actividad de activación de la transcripción. Como tales, los fragmentos terapéuticos (es decir, los fragmentos que tienen actividad biológica suficiente para, por ejemplo, activar la transcripción) son también adecuados para la incorporación en el vector de expresión. Asimismo, una proteína de fusión que comprende un factor atonal asociado o un fragmento terapéutico del mismo y, por ejemplo, un resto que estabiliza la conformación del péptido, también puede estar presente en el vector de expresión. Un factor atonal asociado en funcionamiento o un fragmento terapéutico del mismo transdiferencia las células de soporte en células ciliadas sensoriales, de modo que efectúa deseablemente un cambio en la capacidad del animal para percibir los estímulos ambientales.

El grado de identidad de los aminoácidos se puede determinar usando cualquier procedimiento conocido en la técnica, tal como la base de datos de la secuencia BLAST. Adicionalmente, un homólogo de la proteína puede ser cualquier péptido, polipéptido o porción del mismo que hibrida con la proteína en condiciones de rigurosidad al menos moderada, preferentemente alta, y retiene la actividad. Condiciones de rigurosidad al menos moderada ilustrativas incluyen la incubación durante la noche a 37°C en una solución que comprende 20% de formamida, 5x SSC (NaCl 150 mM, citrato trisódico 15 mM), fosfato sódico 50 mM (pH 7,6), 5x solución de Denhardt, 10% de sulfato de dextrano y 20 mg/ml de ADN de esperma de salmón fragmentado desnaturalizado, seguido de lavado de los filtros en 1x SSC a aproximadamente 37 - 50°C, o en condiciones sustancialmente similares, por ejemplo, las condiciones de rigurosidad moderada descritas en Sambrook et al., *citado anteriormente*. Las condiciones de rigurosidad alta son condiciones que usan, por ejemplo, (1) baja fuerza iónica y una temperatura elevada para el lavado, tal como cloruro sódico 0,015 M/citrato sódico 0,0015 M / 0,1 % de dodecilsulfato sódico (SDS) a 50°C, (2) emplea un agente de desnaturalización durante la hibridación, tal como formamida, por ejemplo 50% (v/v) formamida con 0,1% de seroalbúmina bovina (BSA) / 0,1% de Ficoll/0,1% de polivinilpirrolidona (PVP) / tampón fosfato sódico 50 mM a pH 6,5 con cloruro sódico 750 mM, citrato sódico 75 mM a 42°C, o (3) emplea 50% de formamida, 5x SSC (NaCl 0,75 M, citrato sódico 0,075 M), fosfato sódico 50 mM (pH 6,8), pirofosfato sódico al 0,1%, 5x de solución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sometido a ultrasonidos (50 µg/ml), 0,1 % de SDS, y 10% de sulfato de dextrano a 42°C, con lavados a (i) 42°C en 0,2x de SSC, (ii) a 55°C en 50% de formamida y (iii) a 55°C en 0,1x SSC (preferentemente en combinación con EDTA). Detalles adicionales y una explicación de la rigurosidad de las reacciones de hibridación se proporcionan en, por ejemplo, Ausubel et al., *citado anteriormente*.

La secuencia de ácido nucleico está presente, deseablemente, como parte de un casete de expresión, es decir una secuencia de bases concreta que posee funciones que facilitan la subclonación y la recuperación de una secuencia de ácido nucleico (p. ej. uno o más sitios de restricción) o la expresión de una secuencia de ácido nucleico (p. ej., poliadenilación o sitios de corte y empalme). Cuando el vector de expresión es un vector adenoviral, la secuencia de ácido nucleico que codifica un factor atonal asociado se puede localizar en la región E1 (p. ej., sustituye a la región E1 total o parcialmente) o se puede localizar en la región E4 del genoma adenoviral. Cuando está en la región E4 no se requiere una secuencia espaciadora. El casete de expresión se inserta, preferentemente, en una orientación 3'-5', por ejemplo orientado de tal modo que la dirección de la transcripción del casete de expresión es opuesta a la del genoma adenoviral adyacente. Además del casete de expresión que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica un factor atonal asociado, el vector adenoviral puede comprender otros casetes de expresión que contienen secuencias de ácido nucleico que codifican otros productos génicos, de modo que los casetes pueden sustituir a cualquiera de las regiones delecionadas del genoma adenoviral. La inserción de un casete de expresión en el genoma adenoviral (p. ej., la región E1 del genoma) se puede facilitar mediante procedimientos conocidos, por ejemplo mediante la introducción de un único sitio de restricción en una posición dada del genoma adenoviral. Como se ha indicado anteriormente, preferentemente la región E3 del vector adenoviral se ha delecionado y la región E4 es sustituida por un elemento espaciador.

La secuencia de ácido nucleico está unida operablemente a las secuencias reguladoras necesarias para la expresión, por ejemplo un promotor. Un "promotor" es una secuencia de ADN que dirige la unión de la ARN polimerasa y, de este modo, estimula la síntesis de ARN. Una secuencia de ácido nucleico está "unida operablemente" a un promotor cuando el promotor puede dirigir la transcripción de dicha secuencia de ácido nucleico. Un promotor puede ser nativo o no nativo de la secuencia de ácido nucleico a la que está unido operablemente. Cualquier promotor (es decir, aislado de la naturaleza o producido mediante técnicas de ARN recombinante o sintéticas) se puede usar en relación con la invención para proporcionar la transcripción de la secuencia de ácido nucleico. El promotor es capaz de, preferentemente, dirigir la transcripción de una célula eucariota (deseablemente de mamífero). El funcionamiento del promotor se puede alterar mediante la presencia de uno o más intensificadores (p. ej., el intensificador temprano inmediato del CMV) y/o silenciadores.

La invención usa, preferentemente, un promotor viral. Promotores virales adecuados son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, promotores de citomegalovirus (CMV), tal como el promotor temprano - inmediato del CMV, promotores derivados del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), tal como el promotor de la repetición terminal larga del VIH, promotores del virus del sarcoma de Rous (RSV, tales como la repetición terminal larga del RSV, promotores del virus del tumor de mama en ratones (MMTV), promotores del HS, tales como el promotor Lap2 o el promotor de la timidina quinasa del herpes (Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 78, 144 - 145 (1981)), promotores derivados del virus SV40 o de Epstein Barr, un promotor viral adenoasociado, tal como el promotor p5 y similares.

Preferentemente, el promotor viral es un promotor adenoviral, tal como el promotor tardío principal Ad2 o Ad5 y el promotor líder tripartito del CMV (de origen murino o humano) o un promotor del RSV.

El promotor no tiene que ser un promotor viral. Por ejemplo, el promotor puede ser un promotor celular, es decir, un promotor que dirige la expresión de una proteína celular. Promotores celulares preferidos para usar en la invención dependerán del perfil de expresión deseado para producir el o los agentes terapéuticos. En un aspecto, el promotor celular es, preferentemente, un promotor constitutivo que funciona en varios tipos celulares. Promotores constitutivos adecuados pueden dirigir la expresión de genes que codifican factores de transcripción, genes domésticos, o genes estructurales frecuentes en las células eucariotas. Por ejemplo, el factor de transcripción Ying Yang 1 (YY1) (también conocido como NMP-1, NF-E1, y UCRBP) es un factor de transcripción nuclear ubicuo que es un componente intrínseco de la matriz nuclear (Guo et al., PNAS, 92, 10526 - 10530 (1995)). JEM-1 (también conocido como HGMW and BLZF-1; Tong et al., Leukemia, 12(11), 1733 - 1740 (1998), y Tong et al., Genomics, 69(3), 380 - 390 (2000)), un promotor de la ubiquitina, específicamente UbC (Marinovic et al., J. Biol. Chem., 277(19), 16673 - 16681 (2002)), un promotor de la β -actina, como el derivado de pollo, y similares son adecuados para usar en el procedimiento de la invención.

Muchos de los promotores descritos anteriormente son promotores constitutivos. En lugar de ser un promotor constitutivo, el promotor puede ser un promotor inducible, es decir un promotor que se regula por aumento y/o por incremento en respuesta a las señales adecuadas. Por ejemplo, sistemas de promotor inducible adecuados incluyen, entre otros, el promotor de la IL-8, el sistema de promotor inducible de la metalotionina, el sistema de expresión bacteriana *acZYA*, el sistema de expresión de tetraciclina y el sistema de la polimerasa de T7. Adicionalmente, se pueden usar promotores que se activan selectivamente en diferentes etapas del desarrollo (p. ej., los genes de globina se transcriben diferencialmente a partir de promotores asociados a la globina en embriones y adultos). La secuencia promotora que regula la expresión de la secuencia de ácido nucleico puede contener al menos una secuencia reguladora heteróloga respondedora a la regulación por un agente exógeno. Las secuencias reguladoras son, preferentemente, respondedoras a agentes exógenos, tales como, entre otros, fármacos, hormonas u otros productos génicos. Por ejemplo, las secuencias reguladoras, por ejemplo el promotor, son, preferentemente, respondedoras a los complejos hormona-receptor de glucocorticoides, que, a su vez, intensifican el nivel de transcripción de un péptido terapéutico o un fragmento terapéutico del mismo.

Preferentemente, las secuencias reguladoras comprenden un promotor específico de tejido, es decir un promotor que se activa, preferentemente, en un tejido dado y, cuando se activa, tiene como resultado la expresión de un producto génico en el tejido. Un promotor específico de tejido para usar en el vector de la invención lo puede elegir el experto en la materia en base al tejido o tipo celular diana. Promotores adecuados incluyen, entre otros, BRN.3C, BRN 3,1, el promotor del factor POU ORF3, BRK1, BRK3, el promotor de cordina, el promotor noggin, el promotor jagged1, el promotor jagged2 y el promotor notch1. Promotores específicos de tejido preferidos para usar en el procedimiento de la invención son específicos de las células de soporte o de las células ciliadas sensoriales, tales como un promotor de atonal o un promotor de miosina VIIa, que funcionan en las células ciliadas, un promotor hes-1, que funciona en las células de soporte. Idealmente, se selecciona un promotor que estimule la expresión de un transgén en el epitelio cicatrizado.

También se puede seleccionar un promotor para usar en el procedimiento de la presente invención haciendo corresponder su patrón de actividad concreto con el patrón y el nivel de expresión deseados de la proteína deseada (p. ej., el factor atonal asociado). Como alternativa, se puede construir un promotor híbrido que combine los aspectos deseables de múltiples promotores. Por ejemplo, un promotor híbrido de CMV-RSV que combina la rapidez de actividad inicial del promotor del CMV con el elevado nivel de mantenimiento de la actividad del RSV, es especialmente preferido para usar en muchas realizaciones del procedimiento de la invención. También es posible seleccionar un promotor con un perfil de expresión que pueda manipular un investigador.

En estas líneas, para optimizar la producción de proteínas, preferentemente, la secuencia de ácido nucleico comprende adicionalmente un sitio de poliadenilación tras la región de codificación de la secuencia de ácido nucleico. Se puede usar cualquier secuencia de poliadenilación, incluida una secuencia sintética optimizada, así como la secuencia de poliadenilación de BGH (hormona de crecimiento bovina), virus del poliovirus, TK (timidina quinasa), EBV (virus de Epstein Barr), y los papilomavirus, incluidos los papilomavirus humanos y el BPV (virus del papiloma bovino). Una secuencia de poliadenilación preferida es la secuencia de poliadenilación del SV40 (Virus del sarcoma humano -40). Asimismo, preferentemente, todas las señales de transcripción adecuadas (y señales de traducción cuando sea adecuado) están dispuestas correctamente de forma que la secuencia de ácido nucleico se exprese adecuadamente en las células en las que se introduce. Si se desea, la secuencia de ácido nucleico también puede incorporar sitios de corte y empalme (es decir, sitios donantes de corte y aceptores de corte y empalme) para facilitar la producción de ARN. Además, si la secuencia de ácido nucleico codifica una proteína o péptido, que es una proteína procesada o secretada o actúa intracelularmente, preferentemente, la secuencia de ácido nucleico comprende además las secuencias adecuadas para procesamiento, secreción, localización intracelular y similares.

En determinadas realizaciones, puede ser ventajoso modular la expresión del factor atonal asociado. Un procedimiento especialmente preferido de modular la expresión de una secuencia de ácido nucleico comprende la adición de sitios de recombinación específicos del sitio en el vector de expresión. El contacto de un vector de expresión que comprende sitios de recombinación específicos del sitio con una recombinasa regulará por aumento o

por disminución una secuencia de codificación, o regulará por aumento simultáneamente la transcripción de una secuencia de codificación y regulará por disminución la transcripción de otra, a través del acontecimiento recombinante. El uso de recombinación específica del sitio para modular la transcripción de una secuencia de ácido nucleico se describe en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. 5.801.030 and 6.063.627 y la solicitud de patente internacional WO 97/09439.

A la luz de lo anterior, la invención además proporciona un vector adenoviral que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un factor atonal asociado (p. ej., Math1 o Hath1) o un fragmento terapéutico del mismo, en el que la secuencia de ácido nucleico está unida operablemente a las secuencias reguladoras necesarias para la expresión del factor atonal asociado o un fragmento terapéutico del mismo. El vector adenoviral es defectuoso en al menos una función génica esencial para la replicación de al menos la región E4. La secuencia de ácido nucleico se puede obtener de cualquier fuente, por ejemplo se puede aislar de la naturaleza, generar sintéticamente, aislar de un organismo modificado genéticamente y similares. Vectores adenovirales adecuados y secuencias reguladoras se tratan en el presente documento. Por ejemplo, la invención proporciona adicionalmente un procedimiento de generación de una célula ciliada en el epitelio sensorial diferenciado *in vivo*. El procedimiento comprende poner en contacto células epiteliales sensoriales diferenciadas con un vector adenoviral (a) defectuoso en una o más funciones génicas esenciales para la replicación de la región E2, la región E4 y, opcionalmente, una o más funciones génicas de la región E3, (b) que comprende un espaciador en la región E4, y (c) que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un factor atonal asociado. La secuencia de ácido nucleico se expresa para producir el factor atonal asociado de forma que se genera una célula ciliada. Mientras que el vector adenoviral se puede usar para generar células ciliadas *in vivo* (y, por tanto, es útil para tratar profiláctica o terapéuticamente un trastorno de la audición o un trastorno del equilibrio, se puede producir transdiferenciación de las células de soporte *in vitro* y, por tanto, se pueden usar en procedimientos de investigación.

Vías de administración

Un experto en la materia apreciará que se dispone de procedimientos adecuados para administrar un vector de expresión, tal como un vector adenoviral, en el oído interno. Aunque se puede usar más de una vía para administrar un vector de expresión concreto, una vía determinada puede proporcionar una reacción más inmediata y más eficaz que otra vía. De acuerdo con lo anterior, las vías de administración descritas son meramente ilustrativas y de ningún modo son limitantes.

Con independencia de la vía de administración, el vector de expresión del procedimiento de la invención debe llegar al epitelio sensorial del oído interno. Las vías de administración más directas implican procedimientos quirúrgicos que permiten el acceso al interior de las estructuras del oído interno. La inoculación mediante cocleostomía permite la administración del vector de expresión directamente en las regiones del oído interno asociadas con la audición. La cocleostomía implica la realización de un orificio a través de la pared coclear, por ejemplo en la cápsula ótica debajo de la arteria estapedial como se describe en Kawamoto et al., *Molecular Therapy*, 4(6), 575 - 585 (2001), y libera una composición farmacéutica que comprende el vector de expresión. La administración en el compartimento endolinfático es particularmente útil para administrar el vector adenoviral en las zonas del oído interno responsables de la audición. Como alternativa, el vector de expresión se puede administrar en los canales semicirculares mediante canalostomía. La canalostomía proporciona la expresión transgénica en el sistema vestibular y la cóclea, mientras que la cocleostomía no proporciona una transducción eficiente en el espacio vestibular. El riesgo de dañar la función de la cóclea es reducido con la canalostomía en cuanto a que la inyección directa en el espacio coclear puede dar como resultado daños mecánicos en las células ciliadas (Kawamoto et al., *citado anteriormente*). Los procedimientos de administración también se pueden realizar con fluido (p. ej., perilinfa artificial), que puede comprender factores para aliviar los efectos secundarios del tratamiento o el procedimiento de administración, tales como inhibidores de la apoptosis o antiinflamatorios.

Otra vía de administración directa en el oído interno es a través de la ventana redonda, mediante inyección o tópica en la ventana redonda. La administración a través de la ventana redonda es especialmente preferida para liberar un vector adenoviral en el espacio perilinfático. La expresión transgénica en las neuronas de la cóclea y del vestíbulo y se han sometido a observación al epitelio sensorial coclear y epitelio sensorial coclear tras la administración de los vectores de expresión a través de la ventana redonda (Staecker et al., *Acta Otolaryngol*, 121, 157 - 163 (2001)). Sorprendentemente, parece posible que la captación de vectores de expresión, en particular vectores adenovirales no dirigidos, en las células del oído interno no está mediada por receptores. En otras palabras, no parece que la infección adenoviral de las células en el oído interno está mediada por CAR o integrinas. Para aumentar la transducción de las células en el órgano de Corti tras la administración en el compartimento perilinfático, el vector adenoviral puede liberar uno o más ligandos que intensifican la captación del vector adenoviral en las células diana (p. ej., células de soporte, células de las estrías vasculares etc.). A este respecto, el vector adenoviral puede comprender una o más proteínas de la cubierta adenoviral que se modifican para reducir la unión nativa (p. ej., unión a CAR- y/o unión a integrina) y comprende una secuencia de aminoácidos no nativa que potencia la captación del vector adenoviral por las células diana en el oído interno.

El vector de expresión (p. ej., un vector adenoviral) puede estar presente en una composición farmacéutica para la administración en el oído interno. En determinados casos puede ser adecuado administrar múltiples aplicaciones y/o usar múltiples vías, por ejemplo canalostomía y cocleostomía, para garantizar suficiente exposición de las células de

soporte al vector de expresión.

El vector de expresión puede estar presente en el interior o sobre un dispositivo que permita la liberación controlada o sostenida del vector de expresión, tal como una esponja, una malla, un reservorio mecánico o bomba o un implante mecánico. Por ejemplo, una esponja biocompatible o gelform empapado en una composición farmacéutica que comprende el vector de expresión que codifica un factor asociada con atonal se coloca adyacente a la ventana redonda, que atraviesa el vector de expresión para llagar a la cóclea (como se describe en Jero et al., *citado anteriormente*). Minibombas osmóticas proporcionan liberación sostenida de un vector de expresión durante periodos de tiempo prolongado (p. ej., de cinco a siete días), lo que permite administrar volúmenes pequeños de la composición que comprende el vector de expresión que se va a administrar, que puede prevenir los daños mecánicos que van a producir en células sensoriales endógenas. El vector de expresión también se puede administrar en forma de formulaciones de liberación sostenida (p. ej., véase la patente de EE.UU. 5.378.475) que comprende, por ejemplo, gelatina, condroitín sulfato, un polifosfoéster, tal como, bis-2-hidroxiethyl-terefalato (BHET), o un ácido poliláctico-glicólico.

Aunque no es particularmente preferido, el vector de expresión se puede administrar por vía parenteral, intramuscular, intravenosa o intraperitoneal. Preferentemente, cualquier vector de expresión administrado por vía parenteral a un paciente para generar células ciliadas sensoriales en el oído está específicamente dirigido a las células epiteliales sensoriales, tales como las células de soporte. Deseablemente, el vector de expresión está dirigido al epitelio sensorial cicatrizado para estimular la generación de células ciliadas exógenas para sustituir las células ciliadas endógenas dañadas. Como se ha tratado en el presente documento, un vector de expresión se puede modificar para alterar la especificidad de unión o el reconocimiento de un vector de expresión para un receptor en una potencial célula huésped. Con respecto a los adenovirus, dichas manipulaciones pueden incluir delección de regiones de la fibra, pentón, hexón, inserciones de varios ligandos nativos o no nativos en porciones de la proteína de la cubierta y similares. Un experto en la técnica apreciará que la administración parenteral puede requerir dosis grandes o múltiples administraciones para liberar con eficacia el vector de expresión en las células huésped adecuadas. Vehículos farmacéuticamente aceptables para las composiciones son bien conocidos para los expertos en la materia (véase, *Pharmaceutics and Pharmacy Practice*, J.B. Lippincott Co., Philadelphia, PA, Banker and Chalmers, eds., páginas 238 - 250 (1982), y *ASHP Handbook on Injectable Drugs*, Toissel, 4^a ed., páginas 622 - 630 (1986)). Aunque menos preferido, el vector de expresión también se puede administrar *in vivo* mediante bombardeo con partículas, es decir una pistola génica.

Un experto en la materia también apreciará que se pueden seleccionar dosis y vías de administración para minimizar la pérdida del vector de expresión debido al sistema inmunitario del huésped. Por ejemplo, para poner en contacto las células diana *in vivo* puede ser ventajoso administrar a un huésped un vector de expresión nulo (es decir, un vector de expresión que no comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica un factor atonal asociado antes de realizar el procedimiento de la invención, Antes de la administración, los vector de expresión nulos pueden servir para crear una inmunidad en el huésped al vector de expresión que dificulta los mecanismos de aclaramiento innato del cuerpo, de modo que se disminuye la cantidad del vector analizado mediante el sistema inmunológico.

Dosificación

La dosis del vector de expresión administrada a un animal, particularmente un ser humano, de acuerdo con la invención debería ser insuficiente para afectar a la respuesta deseada en el animal durante un marco de tiempo razonable. Un experto en la técnica reconocerá que la dosis dependerá de varios factores, incluyendo la edad, la especie, la localización del epitelio sensorial dañado, la patología en cuestión (si existe) y la afección o estado patológico. La dosis también depende del factor atonal asociado, así como de la cantidad de epitelio sensorial que se va a transducir. El tamaño de la dosis se determinará también mediante la vía, la cronología y la frecuencia de administración, así como de la existencia, naturaleza y extensión de cualquiera de los efectos secundarios adversos que podrían acompañar a la administración de un vector de expresión concreto (p. ej., traumatismo quirúrgico) y el efecto fisiológico deseado. El experto en la técnica apreciará que varias afecciones, o estados de enfermedad, en concreto afecciones o estados de enfermedad crónicos, pueden requerir un tratamiento prolongado que implica varias administraciones.

Las dosis y regímenes de dosificación adecuados se pueden determinar mediante técnicas de búsqueda de intervalos convencionales conocidas por los expertos en la técnica. Cuando el vector de expresión es un vector viral, más preferentemente un vector adenoviral, de aproximadamente 10^5 partículas virales a aproximadamente 10^{12} partículas virales se administran al paciente. En otras palabras, se puede administrar una composición farmacéutica que comprende una concentración del vector de expresión de aproximadamente 10^5 partículas /ml a aproximadamente 10^{13} partículas/ml (incluidos todos los números enteros dentro del intervalo de aproximadamente 10^5 partículas /ml a aproximadamente 10^{13} partículas/ml), preferentemente de aproximadamente 10^{10} partículas/ml a aproximadamente 10^{12} partículas/ml, y normalmente implicará la administración de aproximadamente 0,1 μ l a aproximadamente 100 μ l de dicha composición farmacéutica directamente en el oído interno. A la luz de lo anterior, la dosis de una administración es, preferentemente, de al menos aproximadamente 1×10^6 partículas (p. ej., de aproximadamente 4×10^5 - 4×10^{12} partículas), más preferentemente de al menos aproximadamente 1×10^7 partículas, más preferentemente de al menos aproximadamente 1×10^8 partículas (p. ej., aproximadamente 4×10^8 - 4×10^{11} partículas), y lo más preferentemente de al menos aproximadamente 1×10^9 partículas a de al menos

aproximadamente 1×10^{10} partículas (p. ej., aproximadamente 4×10^9 - 4×10^{10} partículas) de un vector adenoviral que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un factor atonal asociado. Como alternativa, la dosis de la composición farmacéutica comprende no más de aproximadamente 1×10^{14} partículas, preferentemente no más de aproximadamente 1×10^{13} partículas, incluso más preferentemente no más de aproximadamente 1×10^{12} partículas, incluso más preferentemente no más de aproximadamente 1×10^{11} partículas, y lo más preferentemente no más de aproximadamente 1×10^{10} partículas (p. ej., no más de aproximadamente 1×10^9 partículas). En otras palabras, una única dosis de la composición farmacéutica puede comprender de aproximadamente 1×10^6 unidades de partículas (up), 4×10^6 up, 1×10^7 up, 4×10^7 up, 1×10^8 up, 4×10^8 up, 1×10^9 up, 4×10^9 up, 1×10^{10} up, 4×10^{10} up, 1×10^{11} up, 4×10^{11} up, 1×10^{12} up, o 4×10^{12} up del vector adenoviral (p. ej., el vector adenoviral defectuoso en la replicación). Cuando el vector de expresión es un plásmido, preferentemente se administran de aproximadamente 0,5 ng a aproximadamente 1000 μ g de ADN. Más preferentemente, se administran de aproximadamente 0,1 μ g a aproximadamente 500 μ g, incluso más preferentemente se administran de aproximadamente 1 μ g a aproximadamente 100 μ g de ADN. Lo más preferentemente, de aproximadamente 50 μ g de ADN se administran en el oído interno. Por supuesto, otras vías de administración pueden requerir dosis mayores o menores para alcanzar un efecto terapéutico. El experto en la técnica puede determinar cualquier variación necesaria en las dosificaciones y las vías de administración usando técnicas de rutina conocidas en la materia.

El espacio interior de las estructuras del oído interno es limitado. El volumen de la composición farmacéutica administrado directamente en las estructuras del oído interno debe vigilarse cuidadosamente, ya que la introducción de demasiada composición dañará el epitelio sensorial. Para un paciente humano, el volumen administrado es, preferentemente, de aproximadamente 10 μ l a aproximadamente 2 ml (p. ej., de aproximadamente 25 μ l a aproximadamente 1,5 ml) de la composición. Por ejemplo, se pueden administrar de aproximadamente 50 μ l a aproximadamente 1 ml (p. ej., aproximadamente 100 μ l, 200 μ l, 300 μ l, 400 μ l, 500 μ l, 600 μ l, 700 μ l, 800 μ l o 900 μ l) de la composición. En una realización, todos los contenidos fluidos de la estructura del oído interno, por ejemplo la cóclea o los canales semicirculares, se sustituyen por la composición farmacéutica. En otra realización, una composición farmacéutica que comprende el vector de expresión del procedimiento de la invención se libera lentamente en la estructura del oído interno, de forma que se minimiza el traumatismo mecánico.

Puede ser ventajoso administrar dos o más (es decir, varias) dosis del vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un factor atonal asociado. El procedimiento de la invención proporciona la administración de varias dosis de la secuencia de ácido nucleico que codifica un factor atonal asociado para generar células ciliadas en el epitelio sensorial para modificar la percepción sensorial de un animal. Por ejemplo, al menos dos dosis de un vector de expresión que comprende un ácido nucleico exógeno, por ejemplo una secuencia de ácido nucleico que codifica un factor atonal asociado, se pueden administrar en el mismo oído. Preferentemente, las diversas dosis se administran al tiempo que se retiene la expresión génica de los niveles basales anteriores. También preferentemente, el epitelio sensorial del oído interno entra en contacto con dos dosis o más del vector de expresión en un plazo de aproximadamente 30 días. Más preferentemente se administran dos o más aplicaciones en el oído interno en un plazo de aproximadamente 90 días. No obstante, se pueden administrar tres, cuatro, cinco, seis i más dosis en cualquier plazo de tiempo (p. ej., ., 2, 7, 10, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77, 85 o más días entre dosis), siempre que se produzca expresión génica.

Composición farmacéutica

El vector de expresión de la invención se administra en una composición farmacéutica, que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y el o los vectores de expresión. Se puede usar cualquier vehículo farmacéuticamente aceptable dentro del contexto de la invención y dichos vehículos son bien conocidos en la técnica. La elección del vehículo estará determinada, en parte, por el sitio concreto en el cual se administre la composición y el procedimiento concreto usado para administrar la composición. Idealmente, en el contexto de los vectores adenovirales, la composición farmacéutica carece, preferentemente, de adenovirus de replicación competente.

Formulaciones adecuadas incluyen soluciones acuosas y no acuosas, soluciones isotónicas estériles, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen la formulación isotónica con la sangre o el fluido del oído interno del receptor previsto, y suspensiones acuosas y no acuosas estériles que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizantes y conservantes. La formulación puede incluir endolinfa o perilinfa artificiales, que están disponibles comercialmente. Las formulaciones se pueden presentar en recipientes de dosis unitaria o de dosis múltiple, por ejemplo, ampollas y viales, y se pueden almacenar en estado desecado por congelación (liofilizadas) que solo requiere la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua, inmediatamente antes de su uso. Las soluciones y suspensiones extemporáneas pueden prepararse a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles del tipo descrito previamente. Preferentemente, el vehículo farmacéuticamente aceptable es una solución salina tamponada. Más preferentemente, el vector de expresión para usar en el procedimiento de la invención se administra en una composición farmacéutica formulada para proteger el vector de expresión frente a daños antes de la administración. Por ejemplo, la composición farmacéutica se puede formular para reducir la pérdida del vector de expresión en los dispositivos usados para preparar, almacenar o administrar el vector de expresión, tal como objetos de cristal, jeringuillas o agujas. La composición farmacéutica se puede formular para reducir la disminuir la sensibilidad a la luz y/o la sensibilidad a la temperatura del vector de expresión. Con este fin, la composición farmacéutica comprende, preferentemente un vehículo líquido farmacéuticamente aceptable, tal como, por ejemplo, los descritos anteriormente, y un agente estabilizante

seleccionado del grupo que consiste en polisorbato 80, L-arginina, polivinilpirrolidona, trehalosa y combinaciones de los mismos. El uso de dicha composición farmacéutica prolongará la vida durante el almacenamiento del vector, facilitará la administración e incrementará la eficiencia del procedimiento de la invención. A este respecto, una composición farmacéutica también se puede formular para potenciar la eficiencia de la transducción. Además, un experto en la técnica apreciará que el vector de expresión, por ejemplo un vector viral, puede estar presente en una composición con otros agentes terapéuticos o biológicamente activos. Por ejemplo, puede haber factores terapéuticos útiles en el tratamiento de una indicación concreta. Los factores que controlan la inflamación, tal como ibuprofeno o esteroides, pueden formar parte de la composición para reducir la turgencia e inflamación asociados con la administración *in vivo* del vector viral. Se pueden administrar supresores sistema inmunológico en combinación con el procedimiento de la invención para reducir cualquier respuesta inmunitaria al propio vector o asociada con un trastorno del oído interno. En la composición farmacéutica pueden estar presentes factores angiogénicos, factores neurotróficos, agentes de proliferación y similares. De un modo similar, se pueden coadministrar vitaminas y minerales, antioxidantes y micronutrientes. Puede haber antibióticos, es decir microbicidas y fungicidas, para reducir el riesgo de infección asociado con los procedimientos de transferencia génica y otros trastornos.

15 Otras consideraciones

El procedimiento descrito en la presente invención comprende administrar en el oído interno un vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un factor atonal asociado para modificar la percepción sensorial de un animal generando células ciliadas en el epitelio sensorial del oído interno. La secuencia de ácido nucleico que codifica un factor atonal asociado puede codificar diversas (es decir, dos, tres o más) factores asociados con atonal o diversas copias del mismo factor atonal asociado. No obstante, la mera generación de una célula ciliada no garantiza un cambio en la percepción sensorial en un animal. Se puede generar un número suficiente de células ciliadas y las células ciliadas sensoriales deben estar unidas a una red neural capaz de transmitir señales al cerebro. De acuerdo con lo anterior, aunque no es necesario, puede ser ventajoso proporcionar factores adicionales para garantizar una recepción y transmisión adecuadas de las señales al cerebro.

Se dispone de varias opciones para liberar varias secuencias de codificación en el oído interno. La secuencia de ácido nucleico que codifica el factor atonal asociado puede codificar productos génicos adicionales. El vector de expresión puede comprender, como alternativa o además de, varios casetes de expresión que codifican diferentes productos génicos. Varias secuencias de codificación pueden estar unidas operablemente a diferentes promotores, por ejemplo diferentes promotores que tienen niveles y patrones distintos de actividad. Como alternativa, las diversas secuencias de codificación pueden estar unidas operablemente al mismo promotor para formar un elemento policistrónico. La invención también contempla administrar en el oído interno una mezcla de vectores de expresión, en la que cada vector de expresión codifica un factor atonal asociado u otro producto génico beneficioso para la percepción sensorial. La mezcla de vectores de expresión puede además comprender diferentes tipos de vectores de expresión, por ejemplo vectores adenovirales y vectores virales adenoasociados.

En una realización preferida, el procedimiento también contempla la liberación de una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos un agente neurotrófico. Idealmente, el agente neurotrófico es un estimulador del crecimiento neural que induce el crecimiento, desarrollo y/o maduración de procesos neurales. También pueden administrarse factores neurotróficos para proteger o mantener las neuronas existentes y en desarrollo. Para que una célula ciliada recién generada funcione adecuadamente debe haber una red neural que transmita los impulsos nerviosos al cerebro. De acuerdo con lo anterior, es ventajoso proteger las neuronas existentes asociadas con el epitelio sensorial del oído interno al tiempo que se generan nuevas células ciliadas, inducen el crecimiento y la maduración de nuevos procesos neurales y/o simplemente dirigen los procesos neurales existentes a las células ciliadas sensoriales. Los factores neurotróficos se dividen en tres subclases: citocinas neuropoyéticas, neurotrofinas y los factores de crecimiento de fibroblastos. El factor neurotrófico ciliar (CNTF) es ilustrativo de las citocinas neuropoyéticas. El CNTF estimula la supervivencia de las neuronas ganglionares ciliares y soporta determinadas neuronas que responden al NGF. Las neurotrofinas incluyen, por ejemplo, el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y el factor de crecimiento neural (NGF), que estimula el sobrecrecimiento de las neuritas. Otros factores neurotróficos incluyen, por ejemplo, los factores transformantes del crecimiento, el factor neurotrófico derivado de la línea de las células gliales (GDNF), la neurotrofina 3, la neurotrofina 4/5, y la interleucina 1- β . Los factores neuronotróficos potencian la supervivencia de las neuronas también son adecuados para usar en el procedimiento de la invención. Se ha postulado que los factores neuronotróficos pueden en realidad invertir la degradación de las neuronas. Dichos factores son útiles en el tratamiento de la degeneración de las neuronas asociada con la edad, infecciones o traumatismos. Un factor neuronotrófico preferido es el factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF). El PEDF también se describe en Chader, *Cell Different.*, 20, 209 – 216 (1987), Pignolo et al., *J. Biol. Chem.*, 268(12), 8949 - 8957 (1998), la patente de EE.UU. 5.840.686, y las solicitudes de patente internacional WO 93/24529, WO 99/04806 y WO 01/58494.

Los agentes de proliferación inducen la proliferación celular, preferentemente la proliferación de células de soporte en el oído interno. La multiplicación del número de progenitores de células ciliadas maximiza el efecto biológico del factor atonal asociado. La proliferación de células de soporte está inducida por factores de crecimiento, tales como los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF, en concreto FGF-2), factores de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), E2F, reguladores del ciclo celular y similares. Una secuencia de ácido nucleico que codifica un agente de proliferación se puede administrar junto con la secuencia de ácido nucleico

que codifica un factor atonal asociado en el procedimiento de la invención. Si se desea, la secuencia de ácido nucleico que codifica un agente de proliferación se puede modificar para que ejerza su efecto biológico únicamente sobre el tipo de célula que se va a replicar. Para las células de soporte, el ácido nucleico puede comprender una secuencia reguladora que, preferentemente, se activa en las células de soporte, por ejemplo un promotor que solo es activo en presencia de los factores de transcripción *hes*. El agente de proliferación resultante también se puede modificar para prevenir la secreción en el medio celular. Como alternativa se puede administrar una sustancia en el oído interno para estimular la proliferación celular o potenciar la captación del vector de expresión.

Además de lo anterior, la misma secuencia de ácido nucleico que codifica el factor atonal asociado puede portar uno o más de otros transgenes o puede ser una secuencia de ácido nucleico presente en el mismo vector de expresión o parte de un vector de expresión diferente. Por "transgén" se quiere decir cualquier ácido nucleico que se pueda expresar en una célula. Deseablemente, la expresión de un transgén es beneficiosa, por ejemplo beneficiosa terapéutica o profilácticamente, para el oído interno. Si el transgén confiere un beneficio terapéutico o profilácticamente a una célula, el transgén puede ejercer su efecto a nivel de ARN o de proteínas. Por ejemplo, el transgén puede codificar un péptido distinto al factor atonal asociado que se puede usar en el tratamiento o estudio de un trastorno, por ejemplo un trastorno sensorial que surge de anomalías en el oído interno. Como alternativa, el transgén puede codificar una molécula antisentido, una ribozima, una proteína que afecta al corte y empalme o al procesamiento en 3' (p. ej., poliadenilación) o una proteína que afecta al nivel de expresión de otro gen dentro de la célula (es decir, cuando se considera ampliamente que la expresión génica incluye todas las etapas desde el inicio de la transcripción a la producción de una proteína del proceso), tal como participando en una tasa alterada de acumulación de ARNm o transporte o una alteración en la regulación postranscripcional. El transgén puede codificar un péptido quimérico para el tratamiento de combinación de un trastorno relacionado con el oído interno. El transgén puede codificar un factor que actúa sobre una molécula diana diferente al factor atonal asociado o inicia una cascada de transducción de señal no afectada por el factor atonal asociado. El transgén puede codificar una proteína marcadora, tal como una proteína fluorescente verde o luciferasa. Dichas proteínas marcadoras son útiles en la construcción de vectores y para determinar la migración del vector. Como alternativa, el transgén puede codificar un factor de selección que también es útil en los protocolos de construcción de vectores y se puede usar para seleccionar frente a células no transducidas.

El procedimiento descrito en el presente documento puede formar parte de un régimen de tratamiento que implica otras modalidades terapéuticas. Por tanto, si es adecuado, si el procedimiento de la invención se usa para tratar profiláctica o terapéuticamente un trastorno sensorial, como un trastorno de la audición o un trastorno del equilibrio, que se ha tratado, se está tratando o se tratará con cualquiera de una serie de otras terapias, como terapia farmacológica o cirugía. El procedimiento de la invención también se puede realizar junto con el implante de aparatos para la audición, como un implante coclear. El procedimiento también es particularmente adecuado para procedimientos que implican células madre para regenerar poblaciones de células dentro del oído interno. A este respecto, el procedimiento de la invención se puede poner en práctica *ex vivo* para transducir las células madre, que después se implantan en el oído interno.

El vector de expresión se administra, preferentemente, lo antes posible después de determinar que un animal, tal como un mamífero, específicamente un ser humano, está en riesgo de degeneración de las células ciliadas sensoriales (tratamiento profiláctico) o ha mostrado un número reducido de células ciliadas sensoriales o daños en las mismas (tratamiento terapéutico). El tratamiento dependerá en parte, tras la secuencia de ácido nucleico concreta usada, el factor atonal asociado concreto expresado a partir de la secuencia de ácido nucleico, el vector de expresión, la vía de administración y la causa y extensión, si existe, de la pérdida de células ciliadas o daños en las mismas.

Un vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un factor atonal asociado se puede introducir *ex vivo* en las células previamente eliminadas de un animal dado, en particular un ser humano. Dichas células huésped antólogas u homólogas transducidas pueden ser células progenitoras que se reintroducen en el oído interno del animal o ser humano para expresar el factor atonal asociado y diferenciar en células ciliadas maduras *in vivo*. Un experto en la técnica entenderá que dichas células no se tienen que aislar del paciente sino que se pueden aislar de otro individuo e implantar en el paciente.

El procedimiento descrito en el presente documento también puede implicar la coadministración de otros compuestos farmacéuticamente activos. Por "coadministración" se quiere decir administración antes, junto con, por ejemplo en combinación con el vector de expresión en la misma formulación o en formulaciones separadas, o tras la administración del vector de expresión como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, los factores que controlan la inflamación, tales como ibuprofeno o esteroides, se pueden coadministrar para reducir la inflamación y turgencia asociadas con la administración del vector de expresión. Los agentes inmunosupresores se pueden coadministrar para reducir las respuestas inmunitarias inadecuadas relacionadas con un trastorno del oído interno o la práctica del procedimiento de la invención. De un modo similar se pueden coadministrar vitaminas y minerales, antioxidantes y micronutrientes. Se pueden coadministrar antibióticos, es decir microbicidas y fungicidas, para reducir el riesgo de infección asociado con procedimientos quirúrgicos.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención pero, por supuesto, de ningún modo deben interpretarse como limitantes de su alcance.

Ejemplo 1

5 Este ejemplo demuestra que los vectores adenovirales transducen las células del oído interno de mamífero y dirigen la expresión de un transgén usando varios promotores diferentes.

Se cultivaron utrículos de adultos o cócleas de rata P3 en membranas Millicel en medio Eagle modificado con Dulbecco suplementado con N1 y glucosa. Los cultivos se mantuvieron en condiciones estándar y el medio se cambió cada tres días. Se construyeron estructuras del vector adenoviral que carecen de todo o parte de las regiones E1 y E3 del genoma adenoviral (AdL.10) o que carecen de todo o parte de las regiones E1, E3 y E4 del genoma adenoviral y que comprenden un espaciador localizado en el lugar de la región E4 (AdL. 11D) y se produjeron como se ha descrito anteriormente (véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. 5.851.806 and 5.994.106). Se prepararon seis construcciones de vectores adenovirales usando las estructuras vectoriales AdL.10 o AdL.11D. Cada construcción de vector adenoviral comprendía el gen indicador de la luciferasa unido operablemente a uno de seis promotores, el promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano (AdhCMV.L), el promotor temprano inmediato del citomegalovirus murino (AdmCMV.L), el promotor de la ubiquitina (AdUb.L), el promotor de la β -actina de pollo (AdBA.L), el promotor del sarcoma de rous (AdRSV.L) o el promotor p5 de AAV (Adp5.L).

La expresión de la luciferasa se determinó extrayendo todo el utrículo o el explante coclear en tampón de lisis indicador y la cantidad de proteínas totales se determinó mediante ensayo proteico Bio-Rad. La cantidad de actividad de la luciferasa se determinó mediante luminiscencia y se expresó como unidades lumínicas relativas por μ g de proteína total.

Explantes de órgano de Corti (coclear) de ratones P3 se transdujeron con 1×10^9 unidades de partículas (up) de AdhCMV.L.11D, AdmCMV.L.11D, AdUb.L.11D, AdBA.L.11D, AdRSV.L.11D o Adp5.L.11D. A los cuatro días de la administración, los cultivos del explante se evaluaron para determinar la expresión del transgén. El nivel más elevado observado de expresión del transgén estaba mediado por AdhCMV.L.11D y AdBA.L.11D. Además, se realizó un seguimiento del nivel de expresión del transgén durante los 28 días siguientes a la administración de AdhCMV.L.11D, AdmCMV.L.11D y AdBA.L.11D. Para cada construcción de vector adenoviral, la expresión del transgén varía entre el día 1 y el día 14 después de la administración pero permanece constante después del día 14 y hasta el día 28. No obstante, la expresión del transgén mediada por AdhCMV.L.11D, AdUb.L.11D y AdBA.L.11D en explantes de utrículos de ratones C57B6 fue constante (AdhCMV.L.11D) o aumentó (AdUb.L.11D, AdBA.L.11D) entre el día 1 y el día 14 después de la administración. Se observó que la expresión del transgén mediada por el vector adenoviral en cultivos de explantes de utrículos permanecía estable durante aproximadamente 5 semanas después de la administración y disminuyó a niveles indetectables a la semana 7 de la administración.

Este ejemplo demuestra que los vectores adenovirales defectuosos en la replicación transducen las células de la cóclea y del sistema vestibular *in vitro*. La expresión del transgén mediada por el vector adenoviral se puede observar usando varios promotores y se observó durante al menos 5 semanas después de la administración.

Ejemplo 2

Este ejemplo demuestra que la producción de Math1 mediada por el adenovirus dirige la producción de nuevas células ciliadas en un mamífero.

40 Un vector adenoviral deficiente en E1/E3/E4 que comprende ADNc de Math1 unido operablemente al promotor temprano inmediato del citomegalovirus (CMV) e insertado en la región E1 del genoma adenoviral (AdMath1,11D) se construyó usando procedimientos expuestos en Brough et al., J. Virol, 71, 9206 - 9213 (1997) y Mori et al., J. Cell. Physiol., 188, 253 - 263 (2001). AdMath1,11D se inyectó quirúrgicamente en el fluido endolinfático del tercer giro coclear de la escala media en la cóclea de cobayas maduras a una velocidad de 5μ l en 5 minutos (5×10^{11} partículas/ml de composición). Dado que el volumen de la composición administrada era superior al volumen de la endolinfa presente en la escala media, la inyección de la composición del vector adenoviral tuvo como resultado un daño mecánico en las células ciliadas que revisten la escala media. En los oídos control se inyectó endolinfa sola o construcciones del vector AdMath1,11D que carecen de ADNc de Math1 (AdNull).

La superficie del órgano de Corti se analizó a los 30 o 60 días de la administración de AdMath1,11D usando microscopia electrónica de barrido. Se detectó generación de células ciliadas sensoriales en todas las cobayas tratadas. Se observaron células ciliadas en regiones en las que normalmente no hay células ciliadas, adyacentes al epitelio sensorial del órgano de Corti. También se observaron células ciliadas en el surco interno, las regiones celulares interdentes y la región de células de Hensen localizada lateral al órgano de Corti. En base a su localización, las células ciliadas sensoriales se habían generado como resultado del tratamiento con AdMath1,11D. La inyección de endolinfa o de AdNull no estimuló la generación de células ciliadas en estas regiones. Los animales sacrificados a los 60 días de la administración de AdMath1,11D poseían más células ciliadas sensoriales recién generadas que los animales sacrificados a los 30 días de la administración.

La morfología de la superficie de las células ciliadas sensoriales parecía casi normal. El grado de diferenciación de las células ciliadas sensoriales en el surco interno, la región interdental y la región de células de Hensen se determinó mediante inmunohistoquímica usando anticuerpos anti-miosina VIIa (Hasson et al. Proc. Natl. Acad. Sci., 92, 9815 - 9819 (1995)). Las células positivas para la miosina VIIa se identificaron en la zona medial al OC, en la zona del surco interno y la región interdental, y lateral al órgano de Corti en la región de células de Hensen. La expresión de miosina VIIa en estas células confirma también que las células eran células ciliadas sensoriales diferenciadas.

Para determinar si los procesos neurales crecen hacia las células ciliadas sensoriales generadas por la expresión de Math1, se realizó una tinción doble de la cóclea control y la cóclea tratada con AdMath1,11D con anti-miosina VIIa y anticuerpos anti-neurofilamentos. En tejidos control, la tinción de neurofilamentos fue abundante en la zona del OC, lo que revela la presencia de fibras neurales radiales y longitudinales. No había tinción de neurofilamentos en el surco interno y en las regiones interdenciales de la cóclea control inoculada con endolinfa junto con o con AdNul. Por el contrario, los procesos teñidos con neurofilamentos que se extienden desde la zona del OC en dirección de las células ciliadas sensoriales en la región celular interdental se observó en los tejidos tratados con AdMath1,11D. La tinción demostró que los axones eran atraídos a las células ciliadas sensoriales en la cóclea.

Este ejemplo demuestra que se puede inducir la diferenciación de las células no sensoriales en la cóclea madura de mamífero en células ciliadas sensoriales mediante la expresión de Math1 mediada por adenovirus y que las neuronas en animales maduros son atraídas y se extienden en la dirección de las células ciliadas sensoriales.

Ejemplo 3

Este ejemplo demuestra que el procedimiento de la invención puede afectar a la percepción sensorial en un animal restableciendo, al menos en parte, el equilibrio.

AdMath1,11D, un vector adenoviral defectuoso en todas las funciones génicas esenciales para la replicación de las regiones E1 y E4 del genoma adenoviral, que además carecen de una gran parte de la región E3 del genoma adenoviral y que comprende el ADNc de Math1 unido operablemente al promotor de CMV, se construyeron como se ha descrito en el Ejemplo 2.

Se administró neomicina en el oído interno de los ratones, dañando de este modo las células ciliadas sensoriales del sistema vestibular, lo que tuvo como resultado una pérdida de la conciencia del equilibrio. En una subpoblación de ratones se administraron 1×10^8 - 2×10^8 de AdMath1,11D en 1 μ l de la composición mediante liberación a través de la ventana redonda y en la perilinfa de los canales semicirculares. La evaluación del conocimiento del equilibrio de la posición del cuerpo en ratones se realizó usando una "prueba de nado". Cuando se introdujeron en un tanque con agua, los animales control sin tratar (es decir, ratones normales) necesitaron aproximadamente 8,5 segundos para ponerse derechos y comenzar a nadar intencionadamente. El tratamiento con neomicina daña las células ciliadas sensoriales en el sistema vestibular. Los ratones tratados con neomicina necesitaron 22,2 segundos para ponerse derechos y comenzar a nadar intencionadamente debido a su función alterada del control vestibular. Por el contrario, los ratones tratados con neomicina y AdMath1,11D solo necesitaron 12 segundos para ponerse derechos y comenzar a nadar intencionadamente, lo que sugiere una recuperación funcional de la función vestibular.

Este ejemplo confirma que el procedimiento de la invención puede restablecer la función vestibular tras daños en las células ciliadas sensoriales, de modo que se ha modificado la percepción sensorial de un animal.

Ejemplo 4

Este ejemplo ilustra un procedimiento de liberar en el oído interno un vector adenoviral que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica Math1.

Se produjo sordera en cobayas adultas normales mediante administración subcutánea de kanamicina (500 mg/kg). Dos horas después se administró ácido etacrínico (50 mg/kg) mediante infusión en la vena yugular. El tratamiento con kanamicina y ácido etacrínico tuvo como resultado una pérdida de células ciliadas bilateral en las regiones de frecuencia alta y media de la cóclea, dejando sólo las células de soporte en el epitelio. Las células ciliadas externas se destruyen en la cóclea y las células ciliadas internas se destruyen en los tres primeros giros cocleares. Cuatro días después de la inducción de sordera se inyectó Ad.Math1,11D, descrito anteriormente, en el segundo giro de la escala media (es decir, en el compartimento endolinfático). Los oídos contralaterales no se trataron. Para examinar el reestablecimiento de la audición se realizaron ABR a varias señales de tonos puros.

Las células ciliadas positivas a Math1 recién diferenciadas se detectaron en los giros primero, segundo y tercero de la cóclea a los dos meses de la administración y se correlacionaron directamente con la densidad de las células transducidas con Ad.Math1,11D. Un mes después de la administración de Ad.Math1,11D, los umbrales promedio de ABR mejoraron en los oídos tratados en comparación con los umbrales de ABR de los oídos contralaterales no tratados. Los umbrales de BAR mejoraron adicionalmente a los dos meses de la administración del vector en los oídos tratados.

Este ejemplo demuestra que la liberación de Math1 mediada por adenovirus en epitelio maduro y dañado del oído

interno estimula la diferenciación de célula cocleares no sensoriales en nuevas células ciliadas. La generación de nuevas células ciliadas tiene como resultado la restauración de la función del oído interno.

5 Todas las referencias, incluidas publicaciones, solicitudes de patentes y patentes, citadas en el presente documento se incorporan por referencia en la misma medida en que si se indicara que cada referencia se incorporara individual y específicamente por referencia y se han expuesto en su totalidad en el presente documento.

10 El uso de los términos “un” y “una/uno” y “el/la” y referencias similares en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las reivindicaciones siguientes) se deberá interpretar que abarca tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o esté claramente conraindicado por el contexto. Los intervalos de valores citados en el presente documento están destinados simplemente a servir como método abreviado de hacer referencia individualmente a cada valor por separado que entra dentro del intervalo, a menos que se indique lo contrario en el presente documento, y cada valor distinto se incorpora en la memoria descriptiva como si se hubiera citado individualmente en el presente documento. Todos los procedimientos descritos en el presente documento se pueden realizar en cualquier orden adecuado, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o que, de otro modo, claramente se contradiga en el contexto. El uso de cualquiera y todos los ejemplos, o términos ilustrativos (p. ej., “tal como”) proporcionados en el presente documento está destinado simplemente a iluminar mejor la invención y no impone una limitación del alcance de la invención a menos que se reivindique de otro modo. Ninguna expresión en la memoria descriptiva se debe interpretar como indicativa de ningún elemento no reivindicado esencial en la práctica de la invención.

20 Realizaciones preferidas de la presente invención se describen en el presente documento, incluido el mejor modo conocido por los inventores para llevar a cabo la invención. Por supuesto, las variaciones de estas realizaciones preferidas serán evidentes para los expertos en la técnica a la luz de la lectura de la descripción anterior. Los inventores esperan que los expertos usen dichas variaciones según sea adecuado y los inventores pretenden que la invención se ponga en práctica de otro modo distinto a lo descrito específicamente en el presente documento. De acuerdo con esto, la presente invención incluye todas las modificaciones y equivalentes de la materia objeto citada en las reivindicaciones adjuntas según lo permitido por la legislación aplicable. Además, cualquier combinación de 25 los elementos descritos anteriormente en todas las posibles variaciones de la misma entra dentro de la invención a menos que se indique lo contrario en el presente documento o el contexto contradiga claramente la otra cosa.

Listado de secuencias

<110> GENVEC, INC. BROUGH, DOUGLAS E

5 <120> MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS PARA EL TRATAMIENTO DE TRASTORNOS DEL OÍDO

<130> 226325

<150> US 10/373.249

10 <151> 2003 - 02 - 24

<160> 7

<170> PatentIn versión 3,2

15

<210> 1

<211> 351

<212> PRT

<213> Mus musculus

20

<400> 1

ES 2 511 740 T3

Met Ser Arg Leu Leu His Ala Glu Glu Trp Ala Glu Val Lys Glu Leu
 1 5 10 15

Gly Asp His His Arg His Pro Gln Pro His His Val Pro Pro Leu Thr
 20 25 30

Pro Gln Pro Pro Ala Thr Leu Gln Ala Arg Asp Leu Pro Val Tyr Pro
 35 40 45

Ala Glu Leu Ser Leu Leu Asp Ser Thr Asp Pro Arg Ala Trp Leu Thr
 50 55 60

Pro Thr Leu Gln Gly Leu Cys Thr Ala Arg Ala Ala Gln Tyr Leu Leu
 65 70 75 80

His Ser Pro Glu Leu Gly Ala Ser Glu Ala Ala Ala Pro Arg Asp Glu
 85 90 95

Ala Asp Ser Gln Gly Glu Leu Val Arg Arg Ser Gly Cys Gly Gly Leu
 100 105 110

Ser Lys Ser Pro Gly Pro Val Lys Val Arg Glu Gln Leu Cys Lys Leu
 115 120 125

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

Pro Ser Ser Lys Gln Val Asn Gly Val Gln Lys Gln Arg Arg Leu Ala
 145 150 155 160

Ala Asn Ala Arg Glu Arg Arg Arg Met His Gly Leu Asn His Ala Phe
 165 170 175

ES 2 511 740 T3

Asp Gln Leu Arg Asn Val Ile Pro Ser Phe Asn Asn Asp Lys Lys Leu
 180 185 190
 Ser Lys Tyr Glu Thr Leu Gln Met Ala Gln Ile Tyr Ile Asn Ala Leu
 195 200 205
 Ser Glu Leu Leu Gln Thr Pro Asn Val Gly Glu Gln Pro Pro Pro Pro
 210 215 220
 Thr Ala Ser Cys Lys Asn Asp His His His Leu Arg Thr Ala Ser Ser
 225 230 235 240
 Tyr Glu Gly Gly Ala Gly Ala Ser Ala Val Ala Gly Ala Gln Pro Ala
 245 250 255
 Pro Gly Gly Gly Pro Arg Pro Thr Pro Pro Gly Pro Cys Arg Thr Arg
 260 265 270
 Phe Ser Gly Pro Ala Ser Ser Gly Gly Tyr Ser Val Gln Leu Asp Ala
 275 280 285
 Leu His Phe Pro Ala Phe Glu Asp Arg Ala Leu Thr Ala Met Met Ala
 290 295 300
 Gln Lys Asp Leu Ser Pro Ser Leu Pro Gly Gly Ile Leu Gln Pro Val
 305 310 315 320
 Gln Glu Asp Asn Ser Lys Thr Ser Pro Arg Ser His Arg Ser Asp Gly
 325 330 335
 Glu Phe Ser Pro His Ser His Tyr Ser Asp Ser Asp Glu Ala Ser
 340 345 350

<210> 2

<211> 351

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

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

10

ES 2 511 740 T3

Pro Thr Leu Gln Gly Leu Cys Thr Ala Arg Ala Ala Gln Tyr Leu Leu
 65 70 75 80
 His Ser Pro Glu Leu Gly Ala Ser Glu Ala Ala Ala Pro Arg Asp Glu
 85 90 95
 Ala Asp Ser Gln Gly Glu Leu Val Arg Arg Ser Gly Cys Gly Gly Leu
 100 105 110
 Ser Lys Ser Pro Gly Pro Val Lys Val Arg Glu Gln Leu Cys Lys Leu
 115 120 125
 Lys Gly Gly Val Val Val Asp Glu Leu Gly Cys Ser Arg Gln Arg Ala
 130 135 140
 Pro Ser Ser Lys Gln Val Asn Gly Val Gln Lys Gln Arg Arg Leu Ala
 145 150 155 160
 Ala Asn Ala Arg Glu Arg Arg Arg Met His Gly Leu Asn His Ala Phe
 165 170 175
 Asp Gln Leu Arg Asn Val Ile Pro Ser Phe Asn Asn Asp Lys Lys Leu
 180 185 190
 Ser Lys Tyr Glu Thr Leu Gln Met Ala Gln Ile Tyr Ile Asn Ala Leu
 195 200 205
 Ser Glu Leu Leu Gln Thr Pro Asn Val Gly Glu Gln Pro Pro Pro Pro
 210 215 220
 Thr Ala Ser Cys Lys Asn Asp His His His Leu Arg Thr Ala Ser Ser
 225 230 235 240
 Tyr Glu Gly Gly Ala Gly Ala Ser Ala Val Ala Gly Ala Gln Pro Ala
 245 250 255
 Pro Gly Gly Gly Pro Arg Pro Thr Pro Pro Gly Pro Cys Arg Thr Arg
 260 265 270
 Phe Ser Gly Pro Ala Ser Ser Gly Gly Tyr Ser Val Gln Leu Asp Ala
 275 280 285
 Leu His Phe Pro Ala Phe Glu Asp Arg Ala Leu Thr Ala Met Met Ala
 290 295 300
 Gln Lys Asp Leu Ser Pro Ser Leu Pro Gly Gly Ile Leu Gln Pro Val
 305 310 315 320
 Gln Glu Asp Asn Ser Lys Thr Ser Pro Arg Ser His Arg Ser Asp Gly
 325 330 335
 Glu Phe Ser Pro His Ser His Tyr Ser Asp Ser Asp Glu Ala Ser
 340 345 350

<210> 3

5 <211> 354

<212> PRT

ES 2 511 740 T3

<213> Homo sapiens

<400> 3

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

5

ES 2 511 740 T3

Pro Pro Pro Pro Ala Ser Cys Lys Ser Asp His His His Leu Arg Thr
 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675 680 685 690 695 700 705 710 715 720 725 730 735 740 745 750 755 760 765 770 775 780 785 790 795 800 805 810 815 820 825 830 835 840 845 850 855 860 865 870 875 880 885 890 895 900 905 910 915 920 925 930 935 940 945 950 955 960 965 970 975 980 985 990 995

- <210> 4
- <211> 354
- 5 <212> PRT
- <213> Homo sapiens

- <400> 4

Met Ser Arg Leu Leu His Ala Glu Glu Trp Ala Glu Val Lys Glu Leu
 1 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675 680 685 690 695 700 705 710 715 720 725 730 735 740 745 750 755 760 765 770 775 780 785 790 795 800 805 810 815 820 825 830 835 840 845 850 855 860 865 870 875 880 885 890 895 900 905 910 915 920 925 930 935 940 945 950 955 960 965 970 975 980 985 990 995

10

ES 2 511 740 T3

Asp Glu Val Asp Gly Arg Gly Glu Leu Val Arg Arg Ser Ser Gly Gly
 100 105 110
 Ala Ser Ser Ser Lys Ser Pro Gly Pro Val Lys Val Arg Glu Gln Leu
 115 120 125
 Cys Lys Leu Lys Gly Gly Val Val Val Asp Glu Leu Gly Cys Ser Arg
 130 135 140
 Gln Arg Ala Pro Ser Ser Lys Gln Val Asn Gly Val Gln Lys Gln Arg
 145 150 155 160
 Arg Leu Ala Ala Asn Ala Arg Glu Arg Arg Arg Met His Gly Leu Asn
 165 170 175
 His Ala Phe Asp Gln Leu Arg Asn Val Ile Pro Ser Phe Asn Asn Asp
 180 185 190
 Lys Lys Leu Ser Lys Tyr Glu Thr Leu Gln Met Ala Gln Ile Tyr Ile
 195 200 205
 Asn Ala Leu Ser Glu Leu Leu Gln Thr Pro Ser Gly Gly Glu Gln Pro
 210 215 220
 Pro Pro Pro Pro Ala Ser Cys Lys Ser Asp His His His Leu Arg Thr
 225 230 235 240
 Ala Ala Ser Tyr Glu Gly Gly Ala Gly Asn Ala Thr Ala Ala Gly Ala
 245 250 255
 Gln Gln Ala Ser Gly Gly Ser Gln Arg Pro Thr Pro Pro Gly Ser Cys
 260 265 270
 Arg Thr Arg Phe Ser Ala Pro Ala Ser Ala Gly Gly Tyr Ser Val Gln
 275 280 285
 Leu Asp Ala Leu His Phe Ser Thr Phe Glu Asp Ser Ala Leu Thr Ala
 290 295 300
 Met Met Ala Gln Lys Asn Leu Ser Pro Ser Leu Pro Gly Ser Ile Leu
 305 310 315 320
 Gln Pro Val Gln Glu Glu Asn Ser Lys Thr Ser Pro Arg Ser His Arg
 325 330 335
 Ser Asp Gly Glu Phe Ser Pro His Ser His Tyr Ser Asp Ser Asp Glu
 340 345 350
 Ala Ser

<210> 5

<211> 21

5 <212> PRT

<213> drosophila

ES 2 511 740 T3

<400> 5

Ala Ala Asn Ala Arg Glu Arg Arg Arg Met His Gly Leu Asn His Ala
 1 5 10 15
 Phe Asp Gln Leu Arg
 20

5 <210> 6
 <211> 1393
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

10 <400> 6

aagcttcggt gcacgcgacc tgggtgtgca tctccgagtg agagggggag ggtcagagga 60
 ggaaggaaaa aaaatcagac cttgcagaag agactaggaa ggTTTTggt gttgtgttcc 120
 ggggcttata cccttcggtg aactgggtg ccagcacctc ctctaacacg gcacctccga 180
 gccattgcag tgcgatgtcc cgcctgctgc atgcagaaga gtgggctgag gtaaaagagt 240
 tgggggacca ccatacggccat ccccagccgc accacgtccc gccgctgacg ccacagccac 300
 ctgctaccct gcaggcgaga gaccttcccg tctaccggc agaactgtcc ctctggata 360
 gcaccgacc acgcgcctgg ctgactccca ctttgaggg cctctgcacg gcacgcgccg 420
 cccagtatct gctgcattct cccgagctgg gtgcctccga ggccgcggcg ccccgggacg 480
 aggctgacag ccagggtgag ctggtaagga gaagcggctg tggcggcctc agcaagagcc 540
 ccgggcccgt caaagtacgg gaacagctgt gcaagctgaa gggTggggtt gtagtggacg 600
 agcttggtg cagccgccag cgagcccctt ccagcaaaca ggtgaatggg gtacagaagc 660
 aaaggaggct ggcagcaaac gcaagggaac ggcgcaggat gcacgggctg aaccacgcct 720
 tcgaccagct gcgcaacggt atcccgtcct tcaacaacga caagaagctg tccaaatatg 780
 agaccctaca gatggcccag atctacatca acgctctgtc ggagttgctg cagactccca 840
 atgtcggaga gcaaccgccg ccgcccacag ctctctgcaa aaatgaccac catcaccttc 900
 gcaccgcctc ctctatgaa ggaggtgcgg ggcctctgc ggtagctggg gctcagccag 960
 ccccgggagg gggcccgaga cctacccgc cggggccttg ccggactcgc ttctcaggcc 1020
 cagcttctc tgggggttac tcggtgcagc tggacgcttt gcacttccca gccttcgagg 1080
 acagggccct aacagcgatg atggcacaga aggacctgtc gccttcgctg cccgggggca 1140
 tcctgcagcc tgtacaggag gacaacagca aaacatctcc cagatcccac agaagtgacg 1200
 gagagtttt cccccactct cattacagtg actctgatga ggccagttag gaaggcaaca 1260
 gctccctgaa aactgagaca accaaatgcc ctctctagcg cgcgggaagc cccgtgacaa 1320
 atatccctgc accctttaat ttttggctctg tgggtgatcgt tgttagcaac gacttgactt 1380
 cggacggctg cag 1393

<210> 7

<211> 1572

<212> ADN

<213> Homo sapiens

5

<220>

<221> misc_feature

<222> (1497)..(1497)

<223> "n" puede ser cualquier nucleótido

10

<220>

<221> misc_feature

<222> (1504)..(1504)

<223> "n" puede ser cualquier nucleótido

15

<220>

<221> misc_feature

<222> (1526)..(1526)

<223> "n" puede ser cualquier nucleótido

20

<220>

<221> misc_feature

<222> (1564)..(1564)

<223> "n" puede ser cualquier nucleótido

25

<400> 7

ES 2 511 740 T3

gtcctctgca cacaagaact tttctcgggg tgtaaaaact ctttgattgg ctgctcgcac	60
gcgccctgcc gcgccctcca ttggctgaga agacacgcga ccggcgcgag gaggggggtg	120
ggagaggagc ggggggagac tgagtggcgc gtgccgcttt ttaaaggggc gcagcgcctt	180
cagcaaccgg agaagcatag ttgcacgcga cctggtgtgt gatctccgag tgggtggggg	240
agggtcgagg agggaaaaaa aaataagacg ttgcagaaga gaccggaaa gggccttttt	300
tttggttgag ctggtgtccc agtgctgcct ccgatcctga gcgtccgagc ctttgcagtg	360
caatgtcccg cctgctgcat gcagaagagt gggctgaagt gaaggagtgt ggagaccacc	420
atcgccagcc ccagccgcat catctcccgc aaccgcccgc gccgccgag ccacctgcaa	480
ctttgcaggc gagagagcat cccgtctacc cgctgagct gtccctcctg gacagcaccg	540
acccacgcgc ctggctggct cccactttgc agggcatctg cacggcacgc gccgcccagt	600
atgtgtaca ttccccggag ctgggtgcct cagaggccgc tgcgccccgg gacgaggtgg	660
acggccgggg ggagctggta aggaggagca gcggcggtgc cagcagcagc aagagccccg	720
ggccggtgaa agtgccggaa cagctgtgca agctgaaagg cggggtggtg gtagacgagc	780
tggctgtag ccgccaacgg gcccttcca gcaaacaggt gaatggggtg cagaagcaga	840
gacggctagc agccaacgcc agggagcggc gcaggatgca tgggtgaac cacgccttcg	900
accagctgag caatgttatc ccgtcgttca acaacgacaa gaagctgtcc aaatatgaga	960
ccctgcagat ggcccaaatc tacatcaacg ccttgtccga gctgctacaa acgcccagcg	1020
gaggggaaca gccaccgcc cctccagcct cctgcaaaag cgaccaccac caccttcgca	1080
ccgcggcctc ctatgaaggg ggcgcgggca acgcgaccgc agctggggct cagcaggctt	1140
ccggagggag ccagcggccg accccgcccg ggagttgccg gactcgcttc tcagccccag	1200
cttctgcggg aggtactctg gtgcagctgg acgctctgca cttctcgact ttcgaggaca	1260
gcgccctgac agcgatgatg gcgcaaaaga atttgtctcc ttctctccc gggagcatct	1320
tgcagccagt gcaggaggaa aacagcaaaa cttcgctcgc gtcccacaga agcagcgggg	1380
aattttcccc ccattcccat tacagtgact cggatgaggc aagttaggaa ggtgacagaa	1440
gcctgaaaac tgagacagaa acaaaactgc ctttcccag tgcgcgggaa gccccnggt	1500
taangatccc cgcacccttt aatttnggct ctgcatggt cgttgtttag caacgacttg	1560
gctncagatg gt	1572

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica para la administración en el oído interno, diseñada para cambiar la percepción sensorial de un animal, incluido un ser humano, que comprende un vector adenoviral del subgrupo D que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un factor atonal asociado unido operablemente a un promotor que funciona en las células de soporte del oído interno, en el que la secuencia de ácido nucleico se expresa para producir el factor atonal asociado que tiene como resultado la generación de células ciliadas sensoriales que permiten la percepción de estímulos en el oído interno.
2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que el factor atonal asociado es un factor de transcripción hélice β -bucle-hélice.
- 10 3. La composición farmacéutica de la reivindicación 2, en la que el factor de transcripción hélice β -bucle-hélice es MATH1.
4. La composición farmacéutica de la reivindicación 2, en la que el factor de transcripción hélice β -bucle-hélice es HATH1.
5. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que el promotor es un promotor hes-1.
- 15 6. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que el vector adenoviral comprende un genoma adenoviral que tiene una deficiencia en al menos una función génica esencial para la replicación de la región E1.
7. La composición farmacéutica de la reivindicación 6, en la que el vector adenoviral comprende un genoma adenoviral que tiene una deficiencia en al menos una función génica esencial para la replicación de la región E4.
- 20 8. La composición farmacéutica de la reivindicación 7, en la que el vector adenoviral comprende un espaciador en la región E4.
9. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que la composición comprende un vector viral que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un agente neurotrófico o un agente de proliferación.
10. La composición farmacéutica de la reivindicación 9, en la que el vector adenoviral que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica el factor atonal asociado y el vector viral que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica el agente neurotrófico o el agente de proliferación son el mismo vector viral,
- 25 11. La composición farmacéutica de la reivindicación 9, en la que el agente neurotrófico es un factor de crecimiento tumoral, un factor neurotrófico derivado del cerebro o un factor de crecimiento neural.
12. La composición farmacéutica de la reivindicación 9, en la que el agente de proliferación está seleccionado del grupo que consiste en factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), factores de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento epidérmico, EGF, E2F, y reguladores por aumento del ciclo celular.
- 30 13. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que el vector adenoviral codifica además una proteína de fibra de ablación de unión a un receptor de virus coxsackie y adenovirus (CAR).
14. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que el vector adenoviral codifica además una proteína base pentón de ablación de unión a una o más integrinas.
- 35 15. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que el vector adenoviral es del serotipo 28.