

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 615 180**

51 Int. Cl.:

C07K 14/025 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

C12N 15/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.07.2008 PCT/US2008/069866**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.01.2009 WO09012176**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.07.2008 E 08781733 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.11.2016 EP 2176283**

54 Título: **Métodos y composiciones para el tratamiento de enfermedades cerebrales**

30 Prioridad:

14.07.2007 US 959638 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.06.2017

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF IOWA RESEARCH FOUNDATION (33.3%)
Iowa Centers for Enterprise 2660 University
Capitol Centre
Iowa City, IA 52242-5500, US;
DAVIDSON, BEVERLY L. (33.3%) y
CHEN, YONG HONG (33.3%)**

72 Inventor/es:

**DAVIDSON, BEVERLY L. y
CHEN, YONG HONG**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 615 180 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

Métodos y composiciones para el tratamiento de enfermedades cerebrales

5 Solicitud relacionada

La presente solicitud reivindica prioridad con respecto a la Solicitud de Patente Provisional No. 60/959.638, presentada el 14 de julio de 2007.

10 Apoyo de subvenciones federales

Partes de la presente invención fueron llevadas a cabo con el apoyo del Gobierno de los Estados Unidos a través de la subvención de los National Institutes of Health en virtud del número de subvención HD33531. La administración tiene ciertos derechos en la invención.

15 Antecedentes

La transferencia de genes está reconocida actualmente como una poderosa herramienta para el análisis de eventos biológicos y procesos patológicos tanto a nivel celular como molecular. Más recientemente, la aplicación de genoterapia para el tratamiento de enfermedades humanas, ya sean hereditarias (p.ej. deficiencia de ADA) o adquiridas (p.ej. cáncer o enfermedades infecciosas), ha sido objeto de considerable atención. Con la llegada de mejores técnicas de transferencia de genes y la identificación de una biblioteca en continua expansión de enfermedades relacionadas con anomalías genéticas, la genoterapia ha evolucionado rápidamente pasando de ser una teoría de tratamiento a ser una realidad práctica.

25 Tradicionalmente, la genoterapia se ha definido como un procedimiento en el que se introduce un gen exógeno en las células de un paciente con el fin de corregir un error genético congénito. Aunque, actualmente, se han clasificado como genéticas más de 4500 enfermedades humanas, se han identificado mutaciones específicas en el genoma humano para relativamente pocas enfermedades. Hasta hace poco, dichas enfermedades genéticas raras representaban el único objetivo al que se dirigían los esfuerzos de la genoterapia. En consecuencia, la mayoría de los protocolos de genoterapia aprobados por los NIH hasta la fecha han estado dirigidos hacia la introducción de una copia funcional de un gen defectuoso en las células somáticas de un individuo que tiene un error genético congénito conocido. Tan sólo recientemente, los investigadores y los profesionales clínicos han empezado a apreciar que la mayoría de los cánceres humanos, ciertas formas de enfermedades cardiovasculares y muchas enfermedades degenerativas tienen también importantes componentes genéticos y, para diseñar nuevas genoterapias, deberían considerarse "trastornos genéticos". Por consiguiente, más recientemente, la genoterapia se ha definido de forma general como la corrección de un fenotipo patológico a través de la introducción de nueva información genética en el organismo afectado.

40 En la genoterapia *in vivo*, se introduce un gen transferido en las células del organismo receptor *in situ*, es decir, dentro del receptor. Se ha examinado la genoterapia *in vivo* en varios modelos animales. Varias publicaciones recientes han señalado la viabilidad de la transferencia de genes directa *in situ* a órganos y tejidos, como músculo, células madre hematopoyéticas, la pared arterial, el sistema nervioso y el pulmón. Asimismo, se ha señalado que la inyección directa de ADN en el músculo esquelético, el músculo cardíaco y la inyección de complejos de ADN-lípido en la vasculatura produce un nivel de expresión detectable en el(los) material(es) genético(s) insertado(s) *in vivo*.

50 El tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central, p.ej. los trastornos cerebrales genéticos hereditarios, sigue siendo un problema pendiente de solución. Entre los ejemplos de dichas enfermedades se incluyen las enfermedades por depósito lisosomal. En conjunto, la incidencia de enfermedades por depósito lisosomal (EDL) es de 1 de cada 10.000 nacimientos en el mundo y, en el 65% de los casos, existe una participación significativa del sistema nervioso central (SNC). En estas enfermedades existe un déficit de proteínas, pero cuando se administran por vía intravenosa, no cruzan la barrera hematoencefálica o, cuando se administran directamente al cerebro, no se distribuyen bien. Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de desarrollar terapias para los déficits del SNC.

55 Sumario

La presente invención proporciona una proteína de la cápside del virus adenoasociado (AAV) modificada, tal como se describe en las reivindicaciones. Asimismo, se proporciona un virus AAV que contiene la proteína de la cápside de la invención, un vector viral que comprende un ácido nucleico que codifica la proteína de la cápside de la invención y una célula que comprende el vector viral o transducida por el virus AAV, junto con los usos asociados de la misma, tal como se describe en las reivindicaciones.

65 Los autores de la presente invención han descubierto péptidos que funcionan como agentes diana, tales como vectores virales, para células endoteliales vasculares del sistema nervioso central. La presente divulgación describe un método para utilizar dichos nuevos péptidos para redirigir, por ejemplo cápsides víricas, al tipo de célula de interés. En este caso, se dirigen los péptidos identificados a las células endoteliales que revisten los vasos

sanguíneos del cerebro. Los vectores que albergan proteínas de la cápside modificadas para incluir dichos péptidos se pueden utilizar para proporcionar agentes terapéuticos para el sistema nervioso central (p.ej., el cerebro).

5 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "diana" significa que la proteína de la cápside de un virus, tal como, por ejemplo, un virus adenoasociado (AAV), se une preferentemente a un tipo de tejido (p.ej., tejido hepático) con respecto a otro tipo de tejido (p.ej., tejido del cerebro), y/o se une a un tejido en cierto estado (p.ej., de tipo silvestre o enfermo). En ciertos modos de realización, la proteína de la cápside genéticamente modificada puede "dirigirse" al tejido del epitelio vascular del cerebro uniéndose a un nivel de entre un 10% y 1000% más que una proteína de la cápside sin modificar comparable. Por ejemplo, un AAV que tenga una proteína de la cápside modificada genéticamente se puede unir al tejido del epitelio vascular del cerebro a un nivel de un 50% a 100% más que un virus AAV sin modificar. En ciertos modos de realización, se modifican los ácidos nucleicos que codifican las proteínas de la cápside de un virus, de manera que las cápsides víricas se unen preferentemente al endotelio vascular del cerebro en un mamífero que padece una enfermedad por depósito lisosomal o, utilizando diferentes secuencias, al endotelio vascular del cerebro de tipo silvestre del cerebro de la misma especie.

15 La presente divulgación proporciona una proteína de la cápside del virus adenoasociado (AAV) modificada que contiene un péptido de direccionamiento, teniendo una longitud el péptido de direccionamiento de 3 a 10 aminoácidos, y dirigiendo el péptido de direccionamiento un AAV al endotelio vascular del cerebro. En ciertos modos de realización, el péptido de direccionamiento tiene una longitud de 3, 4, 5, 6 o 7 aminoácidos. En ciertos modos de realización, el AAV es AAV2, si bien se modifica el tropismo para que dichas modificaciones cambien el tropismo de cualquier AAV.

25 En ciertos modos de realización, el péptido de direccionamiento se dirige a endotelio vascular cerebral de tipo silvestre. En ciertos modos de realización, el péptido de direccionamiento es TLH (SEQ ID NO: 3), o QSXY (SEQ ID NO: 4), tal como se expresa en una orientación amino a carboxi o en una orientación carboxi a amino. Se describen también los dipéptidos de direccionamiento PXXPS (SEQ ID NO: 1) o SPXXP (SEQ ID NO: 2), tal como se expresan en la orientación amino a carboxi o en la orientación carboxi a amino. ID NO:1) o SPXXP (SEQ ID NO: 2) tal como se expresan en la orientación amino a carboxi o en la orientación carboxi a amino. En ciertos modos de realización, el péptido de direccionamiento es PYFPSSL (SEQ ID NO:5), YAPLTPS (SEQ ID NO:6), PLSPSAY (SEQ ID NO:7), DSPAHPS (SEQ ID NO:8), GTPTHPS (SEQ ID NO:9), PDAPSNH (SEQ ID NO:10), TEPHWPS (SEQ ID NO:11), SPPLPPK (SEQ ID NO:12), SPKPPPG (SEQ ID NO:13), NWSPWD (SEQ ID NO:14), DSPAHPS (SEQ ID NO:15), GWTLHNK (SEQ ID NO:16), KIPPTLH (SEQ ID NO:17), ISQTLHG (SEQ ID NO:18), QSFYILT (SEQ ID NO:19), o TTQSEYG (SEQ ID NO:20), tal como se expresan en la orientación amino a carboxi o en la orientación carboxi a amino. Debe advertirse que la orientación de la secuencia no es importante. Por ejemplo, el péptido puede estar orientado desde el extremo terminal amino al extremo terminal carboxi del péptido para ser TTQSEYG (SEQ ID NO: 20) o puede estar orientado desde el extremo terminal amino al extremo terminal carboxi del péptido para ser GYESQTT (SEQ ID NO: 42).

40 En ciertos modos de realización, el péptido de direccionamiento se dirige a un endotelio vascular cerebral enfermo. En ciertos modos de realización, el péptido de direccionamiento se dirige al endotelio vascular cerebral en un sujeto que padece enfermedad por depósito lisosomal. En ciertos modos de realización, el péptido de direccionamiento se dirige a un endotelio vascular del cerebro con mucopolisacaridosis (MPS) VII. En ciertos modos de realización, el péptido de direccionamiento es LXSS (SEQ ID NO: 21), o SIXA (SEQ ID NO: 23) tal como se expresan en la orientación amino a carboxi o en la orientación carboxi a amino. Se describe también PFXG (SEQ ID NO: 22) tal como se expresan en la orientación amino a carboxi o en la orientación carboxi a amino. En ciertos modos de realización, el péptido de direccionamiento es MLVSSPA (SEQ ID NO:24), LPSSLQK (SEQ ID NO:25), PPLLKSS (SEQ ID NO:26), PXLKLDSS (SEQ ID NO:27), AWTLASS (SEQ ID NO:28), WPFYGTP (SEQ ID NO:29), GTFPFLG (SEQ ID NO:30), GQVPFMG (SEQ ID NO:31), ANFSILA (SEQ ID NO:32), GSIWAPA (SEQ ID NO:33), o SIAASFS (SEQ ID NO:34), tal como se expresan en la orientación amino a carboxi o en la orientación carboxi a amino.

50 En ciertos modos de realización, el péptido de direccionamiento se dirige a endotelio vascular cerebral TPP1. En ciertos modos de realización, el péptido de direccionamiento es GMNAFRA (SEQ ID NO: 41), tal como se expresa en la orientación amino a carboxi o en la orientación carboxi a amino.

55 La presente divulgación proporciona una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una cápside modificada según se ha descrito.

La presente divulgación proporciona un virus AAV que contiene la proteína de la cápside modificada genéticamente para codificar los péptidos descritos.

60 La presente divulgación proporciona un vector viral que comprende un ácido nucleico que codifica la proteína de la cápside tal como se ha descrito. En ciertos modos de realización, el vector viral contiene además una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el ácido nucleico de interés. En ciertos modos de realización, el ácido nucleico de interés es un agente terapéutico. En ciertos modos de realización, el agente terapéutico es una enzima o una molécula de iARN (p.ej. moléculas de ARNip, ARNhc o miARN). En ciertos modos de realización, el agente terapéutico es β -glucuronidasa o tripeptidil proteasa.

La presente divulgación proporciona una célula que contiene el vector viral antes descrito.

5 La presente divulgación proporciona una célula transducida por el vector viral antes descrito. En ciertos modos de realización, la célula es una célula de mamífero. En ciertos modos de realización, la célula es una célula humana. En otros modos de realización, la célula es una célula no humana. En ciertos modos de realización, la célula es *in vitro* y en otros modos de realización, la célula es *in vivo*. En ciertos modos de realización, la célula es una célula endotelial. En ciertos modos de realización, la célula es una célula endotelial vascular.

10 La presente divulgación proporciona un método para tratar el trastorno cerebral en un mamífero a través de la administración del vector viral antes descrito o la célula antes descrita a dicho mamífero. En ciertos modos de realización, el mamífero es un ser humano. En ciertos modos de realización, la enfermedad es una enfermedad por depósito lisosomal (EDL), como lipofuscinosis ceroide infantil o infantil tardía, enfermedad de Gaucher neuropática, enfermedad de Batten juvenil, enfermedad de Fabry, LMC, síndrome de Sanfilippo A, síndrome de Hunter, enfermedad de Krabbe, síndrome de Morquio, enfermedad de Pompe, enfermedad de Niemann-Pick C, enfermedad de Tay-Sachs, síndrome de Hurler (MPS-I H), síndrome de Sanfilippo B, síndrome de Maroteaux-Lamy, enfermedad de Niemann-Pick A, cistinosis, síndrome de Hurler-Scheie (MPS-I H/S), síndrome de Sly (MPS VII), Scheie (MPS-I S), enfermedad de Batten infantil, gangliosidosis GM1, mucopolidosis tipo II/III o enfermedad de Sandhoff. En ciertos modos de realización, la enfermedad es una enfermedad neurodegenerativa, como enfermedad de Huntington, ELA, hemiplejía espástica hereditaria, esclerosis lateral primaria, atrofia muscular espinal, enfermedad de Kennedy, 20 enfermedad de Alzheimer, una enfermedad de repetición de poliglutamina o enfermedad de Parkinson.

25 La presente divulgación proporciona un método para administrar un agente al sistema nervioso central de un sujeto, por transducción de células endoteliales vasculares con un vector viral tal como se ha descrito, para que las células endoteliales vasculares transducidas expresen el agente terapéutico y suministren el agente al sistema nervioso central del sujeto. En ciertos modos de realización, el vector viral transduce células endoteliales vasculares.

La presente divulgación proporciona un vector viral tal como se ha descrito para su uso en el tratamiento o el diagnóstico médico.

30 La presente divulgación proporciona un uso del vector viral descrito para preparar un medicamento útil para el tratamiento de enfermedad por depósito lisosomal en un mamífero.

35 La presente divulgación proporciona una célula tal como se ha descrito anteriormente para su uso en el tratamiento y el diagnóstico médico.

La presente divulgación proporciona un uso de la célula que se ha descrito para preparar un medicamento útil para el tratamiento de enfermedad por depósito lisosomal en un mamífero.

40 La presente divulgación proporciona un método para identificar péptidos que se dirigen al endotelio vascular del cerebro utilizando bioselección de presentación de fagos para identificar dichos péptidos.

Breve descripción de los dibujos

45 Figuras 1A y 1B. La Figura 1A representa un molde vascular de cerebro humano y 1B presenta cuatro células de la microvasculatura del SNC.

Figuras 2A-2D. Selección de presentación de fagos *in vivo* para identificar motivos de péptido con alta afinidad para la vasculatura cerebral. (Fig. 2A, 2B). Tras 5 rondas de selección de presentación de fagos *in vivo*, se identificaron fagos con motivos de péptido diferenciados de ratones de tipo silvestre (a) y MPS VII (b). (Figs 2C, 2D). Se injertaron individualmente, a través de la vena de la cola, fagos seleccionados y se recuperó y se tituló el fago desde la vasculatura cerebral de ratones de tipo silvestre (c) y MPS VII (d). Los datos se presentan como la media \pm EEM

50 Figuras 3A-3B. El virus modificado con péptido presenta una transducción selectiva de la vasculatura cerebral independiente de sulfato de heparina. (Figs 3A, 3B). Cuatro semanas después de la inyección en la vena de la cola de virus modificado con péptido ($1,0 \times 10^{11}$ partículas de genoma / ratón), se hizo el recuento de los genomas virales por RT-PCR en el cerebro y el hígado de ratones de tipo silvestre (a) y MPS VII (b).

55 Figuras 4A-4K. La administración intravenosa de virus modificados con péptido rescata neuropatologías y déficits del SNC de ratones MPS VII. (Figs. 4A-4B). Las secciones teñidas con azul de toluidina ($1\mu\text{m}$) a través del córtex cerebral (ctx), hipocampo (hc), cuerpo estriado (str), y cerebelo (cb) de ratones MPS VII a los que se inyectó por la vena de la cola AAV-WT o AAV-PFG que expresa β -glucuronidasa. Se muestran imágenes representativas. (Fig. 4I) En el de un ensayo de condicionamiento al miedo contextual, se sometió a ensayo en los ratones MPS VII tratados con virus de control AAV-WT (n=4), ratones MPS VII tratados con AAV-PFG (n=6), y controles heterocigotos (n=6) para determinar su capacidad para discriminar entre un contexto dañino y un contexto benigno (véase métodos). Las disminuciones del tiempo de petrificación se corresponden con la discriminación de contexto intacta. Los datos se presentan como media \pm EEM *p<0,05. (Fig. 4J). La unión de AAV-PFG a vasculatura cerebral requiere sulfato de condroitina. Se incubaron vasculaturas de cerebro purificadas de ratones de tipo silvestre (WT, *Wild Type*) o MPS VII con PBS en solitario, PNGasa (100U/reacción) o condroitinasa ABC

60 (Fig. 4I) En el de un ensayo de condicionamiento al miedo contextual, se sometió a ensayo en los ratones MPS VII tratados con virus de control AAV-WT (n=4), ratones MPS VII tratados con AAV-PFG (n=6), y controles heterocigotos (n=6) para determinar su capacidad para discriminar entre un contexto dañino y un contexto benigno (véase métodos). Las disminuciones del tiempo de petrificación se corresponden con la discriminación de contexto intacta. Los datos se presentan como media \pm EEM *p<0,05. (Fig. 4J). La unión de AAV-PFG a vasculatura cerebral requiere sulfato de condroitina. Se incubaron vasculaturas de cerebro purificadas de ratones de tipo silvestre (WT, *Wild Type*) o MPS VII con PBS en solitario, PNGasa (100U/reacción) o condroitinasa ABC

65

(2U/ reacción). A continuación, las vasculaturas se incubaron con AAV de tipo silvestre o con AAV-PFG (1,0 x 10¹¹ partículas de genoma) en 500µl de PBS. Se hizo el recuento de las partículas virales unidas por PT-PCR. Los datos presentados son la media ± EEM (Fig. 4K). Unión de AAV-PFG a vasculatura cerebral purificada de ratones MPS VII en presencia o ausencia de 2 mg/ml de condroitín sulfato. Los datos se presentan como la media ± EEM.

Figuras 5A-5E. Selección de presentación de fagos *in vivo* en ratones deficientes en TPP1 (CLN2 -/-) (Fig. 5A) Tras 5 rondas de selección, se recuperó un solo péptido ARFANMG. Se tituló el AAV modificado con este péptido a 1,76 x 10¹² genomas virales/ml. (Figs. 5B-5D). La inmunotinción para TPP1 3 semanas después de la inyección en la vena de la cola de virus modificado (1,76 x 10¹¹ genomas virales) en ratones con deficiencia en TPP1- pone de manifiesto la enzima en córtex cerebral (b), mesencéfalo (c) y cerebelo (d). Barras a escala, 50µm. (Fig. 5E) Ensayo *in vitro* para determinar la actividad de TPP1 en diversos tejidos tras la inyección en la vena de la cola de virus modificado con péptido. Los niveles de actividad se expresaron en relación con el control heterocigoto.

15 Descripción detallada

La presente divulgación proporciona un vector viral que comprende una cápside modificada, comprendiendo la cápside modificada al menos una secuencia de aminoácidos que dirige el vector viral al endotelio vascular del cerebro.

En ciertos modos de realización, el vector viral es un vector viral adenoasociado (AAV). En ciertos modos de realización, el AAV es AAV2.

En ciertos modos de realización, la secuencia de aminoácidos que se dirige al endotelio vascular del cerebro comprende o consiste en TLH (SEQ ID NO: 3), QSXY (SEQ ID NO: 4), LXSS (SEQ ID NO: 21), o SIXA (SEQ ID NO: 23), tal como se expresa en una orientación amino a carboxi o en una orientación carboxi a amino.

En ciertos modos de realización, la secuencia de aminoácidos que se dirige al endotelio vascular del cerebro comprende o consiste en PYFPSLS (SEQ ID NO:5), YAPLTPS (SEQ ID NO:6), PLSPSAY (SEQ ID NO:7), DSPAHPS (SEQ ID NO:8), GTPTHPS (SEQ ID NO:9), PDAPSNH (SEQ ID NO:10), TEPHWPS (SEQ ID NO:11), SPPLPPK (SEQ ID NO:12), SPKPPPG (SEQ ID NO:13), NWSPWDP (SEQ ID NO:14), DSPAHPS (SEQ ID NO:15), GWTLHNK (SEQ ID NO:16), KIPPTLH (SEQ ID NO:17), ISQTLHG (SEQ ID NO:18), QSFYILT (SEQ ID NO:19), TTQSEYG (SEQ ID NO:20), MLVSSPA (SEQ ID NO:24), LPSSLQK (SEQ ID NO:25), PPLLKSS (SEQ ID NO:26), PXKLDSS (SEQ ID NO:27), AWTLASS (SEQ ID NO:28), WPFYGTG (SEQ ID NO:29), GTFPFLG (SEQ ID NO:30), GQVPFMG (SEQ ID NO:31), ANFSILA (SEQ ID NO:32), GSIWAPA (SEQ ID NO:33), o SIAASF (SEQ ID NO:34), tal como se expresa en una orientación amino a carboxi o en una orientación carboxi a amino.

En ciertos modos de realización, la secuencia de aminoácidos que se dirige al endotelio vascular del cerebro comprende o consiste en GMNAFRA (SEQ ID NO: 41), tal como se expresa en una orientación amino a carboxi o en una orientación carboxi a amino.

En ciertos modos de realización, la secuencia de aminoácidos que se dirige al endotelio vascular del cerebro comprende al menos una entre SEQ ID NO: 3 y 4.

En ciertos modos de realización, la secuencia de aminoácidos que se dirige al endotelio vascular del cerebro comprende al menos una entre SEQ ID NO: 21 y 23.

En ciertos modos de realización, la secuencia de aminoácidos que se dirige al endotelio vascular del cerebro comprende al menos una entre SEQ ID NO: 5-20.

En ciertos modos de realización, la secuencia de aminoácidos que se dirige al endotelio vascular del cerebro comprende al menos una entre SEQ ID NO: 24-34.

En ciertos modos de realización, la secuencia de aminoácidos que se dirige al endotelio vascular del cerebro se dirige al endotelio vascular del cerebro de un sujeto que tiene una enfermedad, p.ej. una enfermedad por depósito lisosomal.

En ciertos modos de realización, la secuencia de aminoácidos que se dirige al endotelio vascular del cerebro se dirige al endotelio vascular del cerebro de un sujeto que no tiene una enfermedad por depósito lisosomal.

En ciertos modos de realización, el vector viral comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un agente terapéutico. En ciertos modos de realización, el agente terapéutico es β-glucuronidasa.

En ciertos modos de realización, la secuencia de aminoácidos que se dirige al endotelio vascular del cerebro tiene como máximo diez aminoácidos de longitud.

En ciertos modos de realización, la secuencia de aminoácidos que se dirige al endotelio vascular del cerebro es de 3, 4, 5, 6 o 7 aminoácidos de longitud.

5 Ciertos modos de realización de la presente divulgación proporcionan una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un vector viral, tal como se describe en el presente documento.

10 Ciertos modos de realización de la presente divulgación proporcionan una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una cápside modificada tal como se describe en el presente documento. Ciertos modos de realización de la presente divulgación proporcionan una cápside modificada codificada por una secuencia de ácidos nucleicos tal como se describe en el presente documento.

Ciertos modos de realización de la presente divulgación proporcionan una célula que comprende un vector viral tal como se describe en el presente documento.

15 Ciertos modos de realización de la presente divulgación proporcionan una célula transducida por un vector viral tal como se describe en el presente documento.

20 En ciertos modos de realización, la célula es una célula de mamífero. En ciertos modos de realización, la célula es una célula humana. En ciertos modos de realización, la célula es una célula no humana. En ciertos modos de realización, la célula es *in vitro*. En ciertos modos de realización, la célula es *in vivo*. En ciertos modos de realización, la célula es una célula endotelial. En ciertos modos de realización, la célula es una célula endotelial vascular.

25 Ciertos modos de realización de la presente divulgación proporcionan un método para tratar una enfermedad en un mamífero que comprende la administración de un vector viral o célula, tal como se describe en el presente documento, a un mamífero.

En ciertos modos de realización de la divulgación, el mamífero es un ser humano.

30 En cierto modo de realización de la divulgación, la enfermedad es una enfermedad por depósito lisosomal (EDL).

35 En cierto modo de realización de la presente divulgación, la EDL es lipofuscinosis ceroides infantil o infantil tardía, enfermedad de Gaucher neuropática, enfermedad de Batten juvenil, enfermedad de Fabry, LMC, síndrome de Sanfilippo A, síndrome de Hunter, enfermedad de Krabbe, síndrome de Morquio, enfermedad de Pompe, enfermedad de Niemann-Pick C, enfermedad de Tay-Sachs, síndrome de Hurler (MPS-I H), síndrome de Sanfilippo B, síndrome de Maroteaux-Lamy, enfermedad de Niemann-Pick A, cistinosis, síndrome de Hurler-Scheie (MPS-I H/S), síndrome de Sly (MPS VII), Scheie (MPS-I S), enfermedad de Batten infantil, gangliosidosis GM1, mucopolisidosis tipo II/III o enfermedad de Sandhoff.

40 En ciertos modos de realización de la presente divulgación, la enfermedad es una enfermedad neurodegenerativa.

45 En ciertos modos de realización, la enfermedad es una enfermedad neurodegenerativa, como enfermedad de Huntington, ELA, hemiplejía espástica hereditaria, esclerosis lateral primaria, atrofia muscular espinal, enfermedad de Kennedy, enfermedad de Alzheimer, una enfermedad de repetición de poliglutamina o enfermedad de Parkinson.

50 Ciertos modos de realización de la presente divulgación proporcionan el vector viral descrito en el presente documento para su uso en el suministro de un agente al sistema nervioso central de un sujeto no humano, comprendiendo dicho uso la transducción de células del endotelio vascular con un vector viral tal como se describe en el presente documento para que las células del endotelio transducidas expresen el agente terapéutico y suministren el agente al sistema nervioso central del sujeto.

En ciertos modos de realización, el vector viral transduce células del endotelio vascular.

55 Ciertos modos de realización de la presente divulgación proporcionan un vector viral o una célula tal como se describen en el presente documento para su uso en el tratamiento o el diagnóstico médico.

60 Ciertos modos de realización de la presente invención proporcionan un uso de un vector viral o una célula tal como se describe en el presente documento para preparar un medicamento útil para el tratamiento de una enfermedad, p.ej. enfermedad de depósito lisosomal, en un mamífero.

Ciertos modos de realización de la presente divulgación proporcionan un método para identificar péptidos que se dirigen al endotelio vascular del cerebro que comprende el uso de bioselección (*biopanning*) para identificar dichos péptidos.

65 El vector puede comprender además una enzima lisosomal, una proteína secretada, una proteína nuclear o una proteína citoplasmática. Tal como se utiliza, la expresión "proteína secretada" incluye cualquier proteína secretada,

ya sea secretada de forma natural o modificada para contener una secuencia de señal para poder ser secretada. Por ejemplo, una proteína secretada podía ser β -glucuronidasa, proteasa no sensible a la pepstatina, palmitoil proteína tioesterasa.

5 El ácido nucleico está "operativamente unido" cuando está colocado en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. Generalmente, "operativamente unido" significa que las secuencias de ADN que se unen están contiguas. No obstante, los potenciadores no tienen que estar contiguos. La unión se logra por ligación en sitios de restricción convenientes. Si no existen dichos sitios, se utilizan adaptadores o conectores de oligonucleótido sintéticos de acuerdo con la práctica convencional. Asimismo, se pueden unir múltiples copias del ácido nucleico que
10 codifica las enzimas en el vector de expresión. Dichos múltiples ácidos nucleicos se pueden separar mediante conectores.

15 El vector puede ser un vector de virus adenoasociado (AAV), un vector adenoviral, un retrovirus o un vector lentiviral basado en el virus de inmunodeficiencia humana o el virus de inmunodeficiencia felina. En Davidson y col., PNAS (2000) 97:3428-3432, se pueden encontrar ejemplos de dichos AAV. Los AAV y los lentivirus pueden conferir una expresión duradera, mientras que los adenovirus pueden proporcionar una expresión transitoria.

20 La presente divulgación proporciona también una célula de mamífero que contiene un vector según se describe en el presente documento. La célula puede ser humana, y puede ser del cerebro, el bazo, el riñón, el pulmón, el corazón o el hígado. El tipo de célula puede consistir en una población de células madre o progenitoras.

25 La presente divulgación proporciona también un método para tratar una enfermedad genética o un cáncer en un mamífero a través de la administración de un polinucleótido, polipéptido, vector de expresión o célula tal como se describe en el presente documento. La enfermedad genética o el cáncer pueden ser una enfermedad de depósito lisosomal (EDL) como lipofuscinosis ceroides infantil o infantil tardía, enfermedad de Gaucher neuropática, enfermedad de Batten juvenil, enfermedad de Fabry, LMC, síndrome de Sanfilippo A, síndrome de Hunter, enfermedad de Krabbe, síndrome de Morquio, enfermedad de Pompe, enfermedad de Niemann-Pick C, enfermedad de Tay-Sachs, síndrome de Hurler (MPS-I H), síndrome de Sanfilippo B, síndrome de Maroteaux-Lamy, enfermedad de Niemann-Pick A, cistinosis, síndrome de Hurler-Scheie (MPS-I H/S), síndrome de Sly (MPS VII), Scheie (MPS-I S), enfermedad de Batten infantil, gangliosidosis GM1, mucopolisidosis tipo II/III o enfermedad de Sandhoff.

35 La enfermedad genética puede ser una enfermedad neurodegenerativa, como enfermedad de Huntington, ELA, hemiplejia espástica hereditaria, esclerosis lateral primaria, atrofia muscular espinal, enfermedad de Kennedy, enfermedad de Alzheimer, una enfermedad de repetición de poliglutamina o enfermedad de Parkinson.

40 Ciertos aspectos de la divulgación se refieren a polinucleótidos, polipéptidos, vectores y células obtenidas por ingeniería genética (modificadas *in vivo*) y su uso. En particular, la presente divulgación se refiere a un método para aplicar una genoterapia o proteinoterapia capaz de suministrar sistémicamente una dosis terapéuticamente eficaz del agente terapéutico.

45 De acuerdo con uno de sus aspectos, se proporciona un sistema de expresión de célula para expresar un agente terapéutico en un receptor mamífero. El sistema de expresión (también denominado en el presente documento "célula genéticamente modificada") comprende una célula y un vector de expresión para expresar el agente terapéutico. Los vectores de expresión incluyen, sin limitarse sólo a ellos, virus, plásmidos y otros vehículos para suministrar material genético heterólogo a las células. Por consiguiente, el término "vector de expresión", tal como se emplea en el presente documento, se refiere a un vehículo para suministrar material genético heterólogo a una célula. En particular, el vector de expresión es un vector adenoviral recombinante, virus adenoasociado, o lentivirus o retrovirus.

50 El vector de expresión incluye además un promotor para controlar la transcripción del gen heterólogo. El promotor puede ser un promotor inducible (descrito más adelante). El sistema de expresión es adecuado para la administración al receptor mamífero. El sistema de expresión puede comprender varias células genéticamente modificadas no-inmortalizadas, conteniendo cada célula al menos un gen recombinante que codifica al menos un agente terapéutico.

55 El sistema de expresión de célula se puede formar *in vivo*. De acuerdo con otro aspecto más, se proporciona un método para tratar a un receptor mamífero *in vivo*. Dicho método incluye introducir un vector de expresión para expresar un producto génico heterólogo en una célula del paciente *in situ*, como por ejemplo por administración intravenosa. Para formar el sistema de expresión *in vivo*, se introduce un vector de expresión que exprese el agente terapéutico *in vivo* en el receptor mamífero i.v., de manera que el vector se desplaza a través de la vasculatura al cerebro.

60 De acuerdo con otro aspecto más, se proporciona un método para tratar a un receptor mamífero. Dicho método incluye introducir la proteína diana en el paciente *in vivo*.

65 El vector de expresión para expresar el gen heterólogo puede incluir un promotor inducible para controlar la

transcripción del producto génico heterólogo. Por consiguiente, el suministro del agente terapéutico *in situ* se controla exponiendo la célula *in situ* a condiciones que inducen la transcripción del gen heterólogo.

5 El receptor mamífero puede tener una afección susceptible de genoterapia por sustitución. Tal como se utiliza en el presente documento, "genoterapia por sustitución" se refiere a la administración al receptor de material genético exógeno que codifica un agente terapéutico y la subsiguiente expresión del material genético administrado *in situ*. Por lo tanto, la frase "afección susceptible de genoterapia por sustitución" abarca afecciones tales como enfermedades genéticas (es decir, una patología que se puede atribuir a uno o más defectos génicos), patologías adquiridas (es decir, patologías que no se pueden atribuir a un defecto congénito), cánceres y procesos profilácticos (es decir, prevención de una enfermedad o una afección médica no deseada). Por consiguiente, tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "agente terapéutico" se refiere a cualquier agente o material que tiene un efecto beneficioso en el receptor mamífero. Por lo tanto, "agente terapéutico" abarca moléculas tanto terapéuticas como profilácticas que tienen componentes de ácido nucleico o proteína.

15 De acuerdo con un modo de realización, el receptor mamífero tiene una enfermedad genética y el material genético exógeno comprende un gen heterólogo que codifica un agente terapéutico para el tratamiento de la enfermedad. En otro modo de realización más, el mamífero receptor tiene una patología adquirida y el material genético exógeno comprende un gen heterólogo que codifica un agente terapéutico para el tratamiento de la patología. De acuerdo con otro modo de realización, el paciente tiene un cáncer y el material genético exógeno comprende un gen heterólogo que codifica un agente antineoplásico. En otro modo de realización más, el paciente tiene una afección médica no deseada y el material genético exógeno comprende un gen heterólogo que codifica un agente terapéutico para tratar dicha afección. Asimismo, se describe una composición farmacéutica. La composición farmacéutica comprende una pluralidad de las células genéticamente modificadas o polipéptidos que se han descrito y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede ser para tratar una afección susceptible de genoterapia por sustitución y el material genético exógeno comprende un gen heterólogo que codifica un agente terapéutico para el tratamiento de la afección. La composición farmacéutica puede contener una cantidad de células genéticamente modificadas o polipéptidos suficiente para suministrar al paciente la dosis terapéuticamente eficaz del agente terapéutico. A continuación, se describen ejemplos de afecciones susceptibles de genoterapia por sustitución.

20 De acuerdo con otro aspecto, se proporciona un método para formar la composición farmacéutica antes descrita. Dicho método incluye introducir un vector de expresión para expresar un producto génico heterólogo en una célula para formar una célula genéticamente modificada y colocar dicha célula genéticamente modificada en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

25 Estos y otros aspectos, así como diversas ventajas y utilidades se pondrán de manifiesto en mayor medida haciendo referencia a la descripción detallada y las figuras adjuntas.

30 Tal como se utiliza en el presente documento, las expresiones "enzima lisosomal", una "enzima secretada", una "proteína nuclear" o una "proteína citoplasmática" incluyen variantes o fragmentos biológicamente activos o inactivos de dichos polipéptidos. Una "variante" de uno de los polipéptidos es un polipéptido que no es completamente idéntico a una proteína nativa. Dicha proteína variante puede obtenerse alterando la secuencia de aminoácidos por inserción, delección o sustitución de uno o más aminoácidos. La secuencia de aminoácidos de la proteína se modifica por ejemplo por sustitución para crear un polipéptido que tiene sustancialmente las mismas cualidades o mejores cualidades que el polipéptido nativo. La sustitución puede consistir en una sustitución conservada. Una "sustitución conservada" es una sustitución de un aminoácido por otro aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Una sustitución conservada sería una sustitución con un aminoácido que produce el menor cambio posible en la carga de aminoácido o el tamaño de la cadena lateral del aminoácido (como alternativa, el tamaño, la carga o la clase de grupo químico dentro de la cadena lateral) de manera que el péptido global retiene su conformación espacial, pero tiene una actividad biológica alterada. Por ejemplo, los cambios conservados comunes podrían consistir en Asp en Glu; Asn o Gln; His en Lys, Arg o Phe; Asn en Gln, Asp o Glu y Ser en Cys, Thr o Gly. Normalmente, se utiliza alanina para sustituir otros aminoácidos. Los 20 aminoácidos esenciales se pueden agrupar del siguiente modo: alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina que tienen cadenas laterales no polares; glicina, serina, treonina, cistina, tirosina, asparagina y glutamina, que tienen cadenas polares sin cargar; aspartato y glutamato, que tienen cadenas laterales ácidas; y lisina, arginina e histidina que tienen cadenas laterales básicas.

35 Los cambios de aminoácido se consiguen cambiando los codones de la secuencia de ácidos nucleicos correspondiente. Se sabe que dichos polipéptidos se pueden obtener en función de la sustitución de determinados aminoácidos por otros aminoácidos en la estructura de polipéptido para modificar o mejorar la actividad biológica. Por ejemplo, a través de la sustitución de aminoácidos alternativos, se pueden conferir pequeños cambios conformacionales en un polipéptido con el resultado de una mayor actividad. Como alternativa, se pueden emplear sustituciones de aminoácido en determinados polipéptidos para proporcionar restos que pueden unirse entonces a otras moléculas para proporcionar conjugados péptido-molécula que retienen suficientes propiedades del polipéptido de partida para ser útiles para otros propósitos.

- Se puede utilizar el índice hidropático de los aminoácidos para conferir una función biológica interactiva en un polipéptido, observándose que determinados aminoácidos pueden ser sustituidos por otros aminoácidos que tienen índices hidropáticos similares y retienen todavía una actividad biológica similar. Como alternativa, la sustitución de aminoácidos similares puede realizarse sobre la base de la hidrofilia, en particular cuando se pretende que la función biológica deseada en el polipéptido que se va a generar sea su uso en modos de realización inmunológicos. La hidrófilia media local mayor de una "proteína", regida por la hidrofilia de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con su inmunogeneicidad. Por consiguiente, se señala que las sustituciones se pueden realizar en función de la hidrofilia asignada a cada aminoácido.
- Al usar tanto el índice de hidrofilia como el índice de hidropatía, que asigna valores a cada aminoácido, preferentemente, se llevan a cabo las sustituciones de aminoácido cuando estos valores son ± 2 , siendo particularmente de preferencia ± 1 , siendo las sustituciones de preferencia sobre todo a aquellas en las que son ± 0.5 .
- La proteína variante tiene al menos 50%, al menos aproximadamente 80%, o incluso al menos aproximadamente 90%, pero menos de 100%, de homología o identidad de la secuencia de aminoácidos contigua con la secuencia de aminoácidos de la proteína nativa correspondiente.
- La secuencia de aminoácidos del polipéptido variante corresponde esencialmente a la secuencia de aminoácidos del polipéptido nativo. Tal como se utiliza en el presente documento "corresponde esencialmente a" se refiere a una secuencia de polipéptidos que induce una respuesta biológica sustancialmente igual a la respuesta generada por la proteína nativa. Dicha respuesta puede ser al menos un 60% del nivel generado por la proteína nativa, y puede ser al menos 80% del nivel generado por la proteína nativa.
- Una variante puede incluir restos de aminoácido no presentes en la proteína nativa correspondiente o deleciones en relación con la proteína nativa correspondiente. Una variante puede consistir también en un "fragmento" truncado con respecto a la proteína nativa correspondiente, es decir, solamente una porción de la proteína de longitud completa. Las variantes de proteína también pueden incluir péptidos que tienen al menos un D-aminoácido.
- La proteína variante se puede expresar a partir de una secuencia de ADN aislada que codifica la proteína variante. "Recombinante" se define como un péptido o un ácido nucleico producido a través de procesos de ingeniería genética. Debe señalarse que se sabe perfectamente en la técnica que, debido a la redundancia en el código genético, los nucleótidos individuales se pueden intercambiar fácilmente en un codón y siguen teniendo como resultado una secuencia de aminoácidos idéntica. Los términos "proteína", "péptido" y "polipéptido" se utilizan indistintamente en el presente documento.
- La presente divulgación proporciona métodos de tratamiento de una enfermedad en un mamífero por administración de un vector de expresión a una célula o paciente. En cuanto a los métodos de genoterapia, el experto en la técnica de biología molecular y genoterapia, podrá determinar, sin necesidad de una experimentación indebida, las dosis y vías de administración apropiadas del vector de expresión, utilizadas en los nuevos métodos de la presente divulgación.
- De acuerdo con uno de los modos de realización de la divulgación, las células se transforman, o se modifican genéticamente de otro modo, *in vivo*. Se transforman (es decir, transducen o transfectan) las células del receptor mamífero *in vivo* con un vector que contiene el material genético exógeno para expresar un gen heterólogo (p.ej. recombinante) que codifica un agente terapéutico y se suministra *in situ* el agente terapéutico.
- Tal como se utiliza en el presente documento "material genético exógeno" se refiere a un ácido nucleico o a un oligonucleótido, ya sea natural o sintético, que no se encuentra de forma natural en las células; o si se encuentra de forma natural en las células, no lo transcriben o expresan las células a niveles biológicamente significativos. Según esto, "material genético exógeno" incluye por ejemplo un ácido nucleico de origen no natural que se puede transcribir en ARN antisentido, así como un "gen heterólogo" (es decir, un gen que codifica una proteína que no se expresa o que se expresa a niveles biológicamente insignificantes en una célula de origen natural del mismo tipo).
- En ciertos modos de realización de la presente divulgación, el receptor mamífero tiene una afección susceptible de genoterapia por sustitución. Tal como se utiliza en el presente documento "genoterapia por sustitución" se refiere a la administración al receptor del material genético exógeno que codifica un agente terapéutico y la subsiguiente expresión del material genético administrado *in situ*. Por lo tanto, la frase "afección susceptible de genoterapia por sustitución" abarca afecciones tales como enfermedades genéticas (es decir, una patología que se puede atribuir a uno o más defectos génicos), patologías adquiridas (es decir, patologías que no se pueden atribuir a un defecto congénito), cánceres y procesos profilácticos (es decir, prevención de una enfermedad o una afección médica no deseada). Por consiguiente, tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "agente terapéutico" se refiere a cualquier agente o material que tiene un efecto beneficioso sobre el receptor mamífero. Por lo tanto, "agente terapéutico" abarca moléculas tanto terapéuticas como profilácticas que tienen ácido nucleico (p.ej. ARN antisentido) y/o componentes de proteína.
- Se conocen varias enfermedades de depósito lisosomal (por ejemplo enfermedad de Neimann-Pick, síndrome de

Sly, enfermedad de Gaucher). En la Tabla 1, se proporcionan otros ejemplos de enfermedades de depósito lisosomal. Se conocen asimismo agentes terapéuticos efectivos contra dichas enfermedades, dado que se conoce la proteína/enzima de la que se da una deficiencia en estas enfermedades.

5

Tabla I. Lista de supuestas afecciones diana para genoterapia

Enfermedad
Gaucher
Batten juvenil
Fabry
MLD
Sanfilippo A
Batten tardía infantil
Hunter
Krabbe
Morquio
Pompe
Niemann-Pick C
Tay-Sachs
Hurler (MPS-I H)
Sanfilippo B
Maroteaux-Lamy
Niemann-Pick A
Cistinosis
Hurler-Scheie (MPS-I H/S)
Síndrome de Sly (MPS VII)
Scheie (MPS-I S)
Batten infantil
Gangliosidosis GM1
Mucopolidosis tipo II/III
Sandhoff
otras

Tal como se utiliza en el presente documento, "patología adquirida" se refiere a una enfermedad o síndrome que se manifiesta a través de un estado fisiológico, bioquímico, celular, estructural o biológico molecular anormal. En la Tabla 2 se presentan ejemplos de patologías adquiridas. También se proporcionan los agentes terapéuticos eficaces contra estas enfermedades.

10

Tabla II. Posibles genoterapias para enfermedades neuromotoras y otras enfermedades neurodegenerativas

Enfermedad	Candidatos para la sustitución génica ²	Candidatos para efectos dirección ^{3,3}	Sustitución de célula neuronal o progenitora ⁴
ELA	Ninguno	Sí	Sí
Hemiplejía espástica hereditaria	Espastina, paraplegina	Sí	Sí
Esclerosis lateral primaria ⁵	Ninguno	Sí	Sí
Atrofia muscular espinal	Gen de supervivencia de las neuronas motoras, factor de inhibición de apoptosis neuronal	Sí	Sí
Enfermedad de Kennedy	Elemento receptor de andrógeno	Sí	Sí
Enfermedad de Alzheimer		Sí	Sí
Enfermedades por repetición de Poliglutamina		Sí	Sí

²Basado en la bibliografía actual.

³Basado en la bibliografía actual, incluye calbindina, factores tróficos, bcl-2, neurofilamentos y agentes farmacológicos.

⁴Puede incluir terapias basadas en células o células y genes.

⁵Una degeneración esporádica de neuronas corticospinales, cien veces menos común que ELA, sin ninguna conexión genética conocida.

Como alternativa, la afección susceptible de genoterapia por sustitución es un proceso profiláctico, es decir, un proceso para prevenir la enfermedad o una afección médica no deseada. Por lo tanto, la presente divulgación abarca un sistema de expresión de célula para suministrar a un receptor mamífero un agente terapéutico que tiene una función profiláctica (es decir, un agente profiláctico).

En suma, la expresión "agente terapéutico" incluye, sin limitarse solo a ellos, los agentes enumerados en las tablas anteriores, así como sus equivalentes funcionales. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "equivalente funcional" se refiere a una molécula (p.ej. un péptido o una proteína) que tiene el mismo efecto beneficioso o mejorado sobre un receptor mamífero que el agente terapéutico considerado como equivalente funcional. Tal como apreciarán las personas especializadas en la técnica, se pueden producir proteínas funcionalmente equivalentes a través de técnicas recombinantes, p.ej. por expresión de un "ADN funcionalmente equivalente". Tal como se emplea en el presente documento, la expresión "ADN funcionalmente equivalente" se refiere a un ADN que no es de origen natural, que codifica un agente terapéutico. Por ejemplo, muchos, si no todos, los agentes descritos en las Tablas 1-2 tienen secuencias de aminoácidos conocidas codificadas por ácidos nucleicos de origen natural. Sin embargo, como consecuencia de la degeneración del código genético, más de un ácido nucleico puede codificar el mismo agente terapéutico. Por consiguiente, la presente divulgación abarca los agentes terapéuticos codificados por ADN de origen natural, así como ADN que no son de origen natural, que codifican la misma proteína tal como la codifica el ADN de origen natural.

Los agentes terapéuticos y las afecciones susceptibles de genoterapia por sustitución descritos son meramente ilustrativos y no se pretende limitar con ello el alcance de la presente divulgación. Se considera que la selección de un agente terapéutico adecuado para el tratamiento de una afección conocida entra dentro del alcance de la especialidad técnica ordinaria sin necesidad de una indebida experimentación.

Métodos de exploración

La presente divulgación proporciona métodos para tamizar e identificar secuencias de aminoácidos que se dirigen, p.ej. se dirigen específicamente, a un área específica, como la vasculatura del sistema nervioso central. Dicho método se puede utilizar para identificar secuencias de direccionamiento que son específicas para patologías específicas. En otras palabras, las secuencias de direccionamiento se pueden identificar y utilizar en el tratamiento de enfermedades específicas.

Vectores AAV

El virus adenoasociado (AAV) es un virus pequeño (20 nm), no patógeno, útil en el tratamiento de trastornos cerebrales humanos, tales como enfermedad de Parkinson y enfermedad genética recesiva. Se genera una construcción que rodea a un promotor unido a un gen de beta-glucuronidasa con secuencias ITR de AAV.

En un modo de realización, un vector viral de la divulgación es un vector AAV. Un vector "AAV" se refiere a un virus adenoasociado y se puede utilizar para referirse a un virus de tipo silvestre de origen natural por sí mismo o a sus derivados. El término cubre todos los subtipos, serotipos y pseudotipos, así como las formas de origen natural y las recombinantes, a excepción de los casos en que se requiera de otro modo. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "serotipo" se refiere a un AAV que se identifica y se distingue de otros AAV en función de la reactividad de la proteína de la cápside con antisueros definidos, p.ej. existen ocho serotipos conocidos de AAVs de primate, AAV-1 a AAV-8. Por ejemplo, el serotipo AAV-2 se utiliza para referirse a un AAV que contiene proteínas de la cápside codificadas desde el gen Cap de AAV-2 y un genoma que contiene secuencias ITR 5' y 3' del mismo serotipo AAV-2. AAV pseudotipado se refiere a un AAV que contiene proteínas de la cápside de un serotipo y un genoma viral que incluye las ITR 5' y 3'. Sería de esperar que rAAV pseudotipado tuviera propiedades de unión a la superficie celular del serotipo de la cápside y propiedades genéticas conformes al serotipo de ITR. Los rAAV pseudotipados se producen utilizando las técnicas normales descritas en la especialidad. Tal como se utiliza en el presente documento, por ejemplo, rAAV puede utilizarse para referirse a un AAV que tiene tanto las proteínas de la cápside como la ITR 5'-3' del mismo serotipo, como a un AAV que tiene proteínas de la cápside de serotipo 1 y las ITR 5'-3' de un serotipo de AAV diferente, p.ej. serotipo 2 de AAV. Para cada ejemplo ilustrado en el presente documento, la descripción del diseño y producción del vector describe el serotipo de la cápside y las secuencias ITR 5'-3'. La abreviatura "rAAV" se refiere a un virus adenoasociado recombinante, también se refiere a un vector de AAV recombinante (o "vector rAAV").

Un "virus AAV" o una "partícula viral AAV" se refiere a una partícula viral compuesta de al menos una proteína de la cápside de AAV (preferentemente por todas las proteínas de la cápside de un AAV de tipo silvestre) y un polinucleótido encapsidado. Si la partícula comprende polinucleótido heterólogo (es decir, un polinucleótido distinto al genoma AAV de tipo silvestre, como un transgén que ha de ser suministrado a una célula de mamífero), normalmente se denomina "rAAV".

En un modo de realización, los vectores de expresión AAV se construyen empleando técnicas conocidas para al menos proporcionar como componentes operativamente unidos en la dirección de la transcripción, elementos de control que incluyen una región de iniciación transcripcional, el ADN de interés y una región de terminación

transcripcional. Los elementos de control se seleccionan para que sean funcionales en una célula de mamífero. La construcción resultante que contiene los componentes operativamente unidos está flanqueada (5' y 3') con secuencias ITR de AAV funcionales.

5 "Repeticiones terminales invertidas de virus adenoasociado" o "ITR de AAV" se refiere a regiones reconocidas en la técnica encontradas en cada extremo del genoma AAV que funcionan en combinación en cis como origen de la replicación de ADN y como señales de empaquetamiento para el virus. Las ITR de AAV junto con la región que codifica Rep, proporcionan una escisión y un rescate eficientes y la integración de una secuencia de nucleótidos interpuesta entre dos ITR flanqueadoras en un genoma de célula de mamífero.

10 Se conocen las secuencias de nucleótidos de las regiones ITR de AAV. Véase por ejemplo Kotin, R. M. (1994) Human Gene Therapy 5:793-801; Berns, K. I. "Parvoviridae and their Replication" in Fundamental Virology, 2ª Edición, (B. N. Fields and D. M. Knipe, eds.). Tal como se utiliza en el presente documento "ITR de AAV" no tiene por qué tener la secuencia de nucleótidos de tipo silvestre, sino que puede alterarse, p.ej. por inserción, delección o sustitución de nucleótidos. Adicionalmente, la ITR de AAV puede derivarse de cualquiera de los distintos serotipos AAV, incluyendo, pero sin limitarse a ellos, AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAVX7, etc. Asimismo, las ITR 5' y 3' que flanquean una secuencia de nucleótidos seleccionada en un vector AAV no tienen por qué ser idénticas o derivarse necesariamente del mismo serotipo o aislado de AAV, siempre y cuando funcionen tal como se pretende, es decir, para permitir la escisión y el rescate de la secuencia de interés de un vector o genoma de célula hospedadora, y permitir la integración de la secuencia heteróloga en el genoma de célula receptora cuando los productos génicos Rep de AAV están presentes en la célula.

25 En un modo de realización, las ITR de AAV pueden proceder de cualquiera de los diversos serotipos de AAV, incluyendo, pero sin limitarse a ellos, AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAVX7, etc. Asimismo, las ITR 5' y 3' que flanquean una secuencia de nucleótidos seleccionada en un vector de expresión de AAV no tienen por qué ser idénticos o derivarse necesariamente del mismo serotipo o aislado de AAV, siempre y cuando funcionen tal como se pretende, es decir, para permitir la escisión y rescate de la secuencia de interés del vector o genoma de la célula hospedadora y permitir la integración de la molécula de ADN en el genoma de la célula receptora cuando los productos génicos Rep de AAV están presentes en la célula.

30 En un modo de realización, las cápsides de AAV se pueden derivar de cualquiera de los diversos serotipos de AAV, incluyendo, sin limitarse a ellos, AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV6, o AAV8, y las ITR de AAV proceden del serotipo 2 de AAV. Las moléculas de ADN adecuadas para su uso en vectores AAV tendrán menos de aproximadamente 5 kilobases (kb), menos de aproximadamente 4.5 kb, menos de aproximadamente 4kb, menos de aproximadamente 3.5 kb, menos de aproximadamente 3 kb, menos de aproximadamente 2.5 kb de tamaño y se conocen centro de la técnica.

40 En algunos modos de realización de la divulgación, las moléculas de ADN para su uso en los vectores de AAV contendrán una o más copias de una única secuencia de ARNip. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión múltiples copias de una secuencia de ARNip significa al menos 2 copias, al menos 3 copias, al menos 4 copias, al menos 5 copias, al menos 6 copias, al menos 7 copias, al menos 8 copias, al menos 9 copias y al menos 10 copias. En algunos modos de realización, las moléculas de ADN para su uso en los vectores de AAV contendrán múltiples secuencias de ARNip. Tal como se utiliza en el presente documento la expresión múltiples secuencias de ARNip significa al menos 2 secuencias de ARNip, al menos 3 secuencias de ARNip, al menos 4 secuencias de ARNip, al menos 5 secuencias de ARNip, al menos 6 secuencias de ARNip, al menos 7 secuencias de ARNip, al menos 8 secuencias de ARNip, al menos 9 secuencias de ARNip y al menos 10 secuencias de ARNip. En algunos modos de realización, los vectores de ADN adecuados de la divulgación contendrán una secuencia que codifica las moléculas de ARNip de la divulgación y un fragmento de relleno. Entre los fragmentos de relleno adecuados de la divulgación se incluyen secuencias conocidas en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a ellas, secuencias que no codifican una molécula de proteína expresada, secuencias que codifican una proteína celular normal que no tengan un efecto perjudicial en los tipos de célula en los que se expresan; y secuencias que no codifiquen una molécula dúplex de ARNip funcional ellas mismas.

55 En un modo de realización, las moléculas de ADN adecuadas para su uso en vectores de AAV tendrán menos de aproximadamente 5 kilobases (kb) de tamaño e incluirán, por ejemplo, una secuencia de relleno y una secuencia que codifica una molécula de ARNip de la divulgación. Por ejemplo, para prevenir cualquier empaquetamiento de las secuencias genómicas de AAV que contienen genes Rep y Cap, se puede modificar un plásmido que contiene el fragmento de ADN Rep y Cap por inclusión de un fragmento de relleno, tal como se conoce en la técnica, en el genoma AAV que provoca que el ADN exceda la longitud para un empaquetamiento óptimo. Por tanto, el fragmento auxiliar no está empaquetado en viriones AAV. Se trata de una característica de seguridad que asegura que solamente se empaqueta en viriones un genoma de vector de AAV recombinante que no excede el tamaño de empaquetamiento óptimo. Un fragmento auxiliar de AAV que se incorpora en una secuencia de relleno puede exceder la longitud de genoma de tipo silvestre de 4,6 kb, y no se empaquetarán longitudes por encima de 105% del tipo silvestre. El fragmento de relleno se puede derivar por ejemplo de fuentes no virales tales como gen Lac-Z o beta-galactosidasa.

65

En un modo de realización, la secuencia de nucleótidos seleccionada está unida operativamente a elementos de control que dirigen su transcripción o expresión a un sujeto *in vivo*. Dichos elementos de control pueden comprender secuencias de control normalmente asociadas con el gen seleccionado. Como alternativa, pueden emplearse secuencias de control heterólogas. Las secuencias de control heterólogas útiles incluyen generalmente las derivadas de secuencias que codifican genes de mamífero o virales. Entre sus ejemplos se incluyen, pero sin limitarse a ellos, el promotor temprano SV40, promotor LTR de virus de tumor mamario de ratón; promotor mayor tardío de adenovirus (AD MLP); un promotor de virus herpes simple (VHS), un promotor de citomegalovirus (CMV), como la región del promotor inmediato temprano de CMV (CMVIE), un promotor de virus de sarcoma de Rous (RSV), promotores pol II, promotores pol III, promotores sintéticos, promotores híbridos y similares. Asimismo, encontrarán uso en el presente documento secuencias derivadas de genes no virales, tales como gen de la metalotioneína murina. Dichas secuencias de promotor están comercializadas, p.ej. Stratagene (San Diego, California).

En un modo de realización, pueden resultar particularmente útiles tanto los promotores heterólogos como otros elementos de control, como promotores específicos del SNC o inducibles, potenciadores y similares. Entre los ejemplos de promotores heterólogos se incluyen el promotor de CMB. Entre los ejemplos de promotores específicos del SNC se incluyen los aislados de genes de proteína básica de la mielina (MBP), proteína ácida fibrilar de glía (GFAP) y enolasa específica de neurona (NSE). Entre los ejemplos de promotores inducibles se incluyen elementos de respuesta del ADN para ecdisona, tetraciclina, hipoxia y aúfina.

En un modo de realización, el vector de expresión de AAV que alberga la molécula de ADN de interés unida a las ITR de AAV puede construirse insertando directamente la(s) secuencia(s) seleccionada(s) en un genoma AAV al que se le han recortado los marcos de lectura abierta (ORF) de AAV principales. Se pueden suprimir otras porciones del genoma de AAV, siempre y cuando permanezca una porción suficiente de las ITR para permitir las funciones de replicación y empaquetamiento. Dichas construcciones se pueden diseñar empleando técnicas muy conocidas en la especialidad.

Como alternativa, se pueden recortar las ITR de AAV desde el genoma viral o desde un vector AAV que lo contiene y fusionar 5' y 3' de una construcción de ácido nucleico seleccionada que está presente en otro vector utilizando técnicas de ligamiento normales. Por ejemplo, se pueden llevar a cabo ligamientos en Tris-Cl 20 mM, pH 7,5, MgCl₂, 10 mM, DTT 10 mM, 33µg/ml de BSA, NaCl 10 mM-50 mM y, o bien 40 µM ATP, 0,01-0,02 unidades (Weis) T4 ADN ligasa a 0 °C (ligación de extremos cohesivos), o bien ATP 1 mM, 0,3-0,6 unidades (Weis) T4ADN ligasa, a 14 °C (para ligación de extremos romos). Las ligaciones de "extremos cohesivos" intermoleculares se llevan a cabo normalmente a concentraciones del total de ADN de 30-1000 µg/ml (concentración final total 5-100 nM). Vectores AAV que contienen ITR, en particular, se describen en el presente documento varios vectores AAV que están disponibles en la American Type Culture Collection ("ATCC") con los números de acceso 53222, 53223, 53224, 53225 y 53226.

Asimismo, se pueden producir sintéticamente genes quiméricos para que incluyan secuencias ITR de AAV dispuestas en 5' y 3' de una o más de las secuencias de ácido nucleico seleccionadas. Se pueden utilizar los codones que se prefieran para la expresión de la secuencia de genes quiméricos en células del SNC de mamífero. La secuencia quimérica completa se ensambla desde los oligonucleótidos superpuestos preparados a través de los métodos normales.

Para producir viriones rAAV, se introduce un vector de expresión de AAV en una célula hospedadora adecuada utilizando técnicas conocidas, como por transfección. Se conocen varias técnicas de transfección en la especialidad. Véase, p.ej. Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning, a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratories, New York. Entre los métodos de transfección adecuados en particular se incluyen co-precipitación con fosfato de calcio, microinyección directa en células de cultivo, electroporación, transferencia génica mediada por lisosomas, transducción mediada por lípidos y suministro de ácido nucleico utilizando microproyectiles de alta velocidad.

En un modo de realización, las células hospedadoras adecuadas para producir viriones de rAAV incluyen microorganismos, células de levadura, células de insecto y células de mamífero que pueden ser, o que han sido, utilizadas como receptoras de una molécula de ADN heterólogo. El término incluye la progenie de la célula original que ha sido transfectada. Por lo tanto, una "célula hospedadora", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere por lo general a una célula que ha sido transfectada con una secuencia de ADN exógena. En la práctica de la presente divulgación, se pueden utilizar las células de una línea celular humana estable, 293 (fácilmente disponibles, p.ej. a través de la American Type Culture Collection con el número de acceso ATCC CRL1573). En particular, la línea celular humana 293 es una línea celular de riñón embrionario humano que ha sido transformada con fragmentos ADN de adenovirus tipo 5, y expresa los genes adenovirales E1a y E1b. La línea celular 293 se transfecta fácilmente y proporciona una plataforma en la que producir viriones rAAV particularmente conveniente.

En un modo de realización, se hace que las células hospedadoras que contienen los vectores de expresión de AAV antes descritos sean capaces de proporcionar funciones de auxiliar de AAV para replicar y encapsidar las secuencias de nucleótido flanqueadas por las ITR de AAV para producir viriones de rAAV. Las funciones de auxiliar de AAV son generalmente secuencias de codificación derivadas de AAV que se pueden expresar para proporcionar productos génicos que, a su vez, funcionan en trans para replicación productiva de AAV. Las funciones de auxiliar

de AAV se utilizan en el presente documento para complementar funciones de AAV necesarias que faltan en los vectores de expresión de AAV. Por lo tanto, las funciones de auxiliar de AAV incluyen uno o ambos ORF principales de AAV, en concreto las regiones de codificación Rep y Cap, u homólogos funcionales de los mismos.

5 Se ha demostrado que los productos de expresión Rep poseen muchas funciones, incluyendo, entre otras: reconocimiento, unión y mellado del origen AAV de replicación de ADN; actividad de helicasa de ADN y modulación de transcripción desde promotores de AAV (u otros heterólogos). Los productos de expresión Cap suministran las funciones de empaquetamiento necesarias. Las funciones de auxiliar de AAV se utilizan en la presente divulgación para complementar funciones AAV en trans que faltan en los vectores AAV.

10 La expresión "construcción auxiliar de AAV" se refiere generalmente a una molécula de ácido nucleico que incluye secuencias de nucleótido que proporcionan funciones de AAV suprimidas del vector AAV que se ha de utilizar para producir un vector de transducción para suministrar una secuencia de nucleótidos de interés. Los construcciones auxiliares de AAV se utilizan normalmente para proporcionar expresión transitoria de genes Rep y/o Cap de AAV para complementar las funciones de AAV que faltan, que son necesarias para la replicación de AAV lítica; no obstante, los construcciones auxiliares carecen de ITR de AAV y no pueden replicarse ni empaquetarse ellas mismas. Las construcciones auxiliares de AAV pueden darse en forma de un plásmido, fago, transposón, cósmido, virus o virión. Se han descrito varias construcciones auxiliares de AAV, tales como los plásmidos pAAV/Ad y pIM29+45, utilizados normalmente, que codifican productos de expresión Rep y/o Cap.

20 "Región que codifica Rep de AAV" significa la región reconocida en la técnica de un genoma de AAV que codifica las proteínas de replicación Rep 78 Rep 68, Rep 52 y Rep 40. Se ha demostrado que estos productos de expresión Rep poseen muchas funciones, entre las que se incluyen reconocimiento, unión y mellado del origen AAV de replicación de ADN, actividad helicasa de ADN y modulación de la transcripción desde promotores de AAV (u otros heterólogos). Los productos de expresión Rep son necesarios colectivamente para la replicación del genoma de AAV. Entre los homólogos de la región de codificación Rep de AAV adecuados se incluye el gen Rep de herpesvirus humano 6 (HHV-6) que es conocido también por mediar la replicación de ADN de AAV-2.

30 "Región de codificación Cap de AAV" significa la región reconocida en la técnica del genoma de AAV que codifica las proteínas de la cápside VP1, VP2 y VP3, u homólogos funcionales de las mismas. Los productos de expresión de Cap proporcionan las funciones de empaquetamiento que se necesitan colectivamente para empaquetar el genoma viral.

35 En un modo de realización, las funciones de auxiliar de AAV se introducen en la célula hospedadora por transfección de la célula hospedadora con una construcción de auxiliar de AAV antes de la transfección del vector de expresión de AAV o al mismo tiempo. Las construcciones auxiliares de AAV se utilizan de este modo para proporcionar al menos una expresión transitoria de los genes Rep y/o Cap de AAV para complementar las funciones de AAV que faltan, que son necesarias para una infección de AAV productiva. Las construcciones auxiliares de AAV carecen de ITR de AAV y no pueden replicarse ni empaquetarse ellas mismas. Dichas construcciones pueden darse en forma de un plásmido, fago, transposón, cósmido, virus o virión. Se han descrito varias construcciones auxiliares de AAV, tales como los plásmidos pAAV/Ad y pIM29+45 utilizados normalmente, que codifican productos de expresión Rep y Cap. Se han descrito otros vectores que codifican productos de expresión Rep y/o Cap.

45 En otro modo de realización, tanto los vectores de expresión de AAV como las construcciones auxiliares de AAV se pueden construir de manera que contengan uno o más marcadores seleccionables opcionales. Entre los marcadores adecuados se incluyen genes que confieren resistencia a los antibióticos o sensibilidad para impartir color o para cambiar las características antigénicas de las células que han sido transfectadas con una construcción de ácido nucleico que contiene el marcador seleccionable cuando se cultivan las células en un medio selectivo apropiado. Entre los diversos genes marcadores seleccionables que son útiles en la práctica de la divulgación se incluyen el gen resistente a higromicina B (que codifica la aminoglucósido fosfotransferasa (APH)), que permite la selección en células de mamífero confiriendo resistencia a G418 (disponible de Sigma, St. Louis, Mo.). Los expertos en la técnica conocen otros marcadores adecuados.

55 En un modo de realización, se hace que la célula hospedadora (o célula de empaquetamiento) sea capaz de proporcionar funciones no derivadas de AAV, o "funciones accesorias" para producir viriones rAAV. Las funciones accesorias son funciones virales y/o celulares no derivadas de AAV de las que depende AAV para su replicación. Por tanto, las funciones accesorias incluyen al menos las proteínas y los ARN no derivados de AAV que se requieren en la replicación de AAV, incluyendo las que participan en la activación de la transcripción génica de AAV, corte y empalme de ARNm de AAV específico de etapa, replicación de ADN de AAV, síntesis de productos de expresión Cap y ensamblaje de la cápside de AAV. Las funciones accesorias con base viral pueden derivarse de cualquiera de los virus auxiliares conocidos.

65 En un modo de realización, se pueden introducir las funciones accesorias en las células hospedadoras y después expresarse en ellas aplicando métodos conocidos por los expertos en la técnica. Normalmente, las funciones accesorias se proporcionan infectando las células hospedadoras con un virus auxiliar no relacionado. Se conocen varios virus auxiliares adecuados, entre los que se incluyen adenovirus, herpesvirus, tales como virus del herpes

simple tipos 1 y 2, y virus variolovacunal. Las funciones accesorias no virales también encontrarán uso en la presente divulgación, como por ejemplo, las que proporcionan la sincronización celular utilizando cualquiera de los distintos agentes conocidos.

5 En un modo de realización, se proporcionan las funciones accesorias utilizando un vector de función accesoría. Los vectores de función accesoría incluyen secuencias de nucleótido que proporcionan una o más funciones accesorias. Un vector de función accesoría presenta la capacidad de ser introducido en una célula hospedadora adecuada para soportar una producción de virión de AAV eficiente en la célula hospedadora. Los vectores de función accesoría pueden darse en forma de plásmido, fago, transposón o cósmido. Los vectores accesorios pueden también darse en forma de uno o más fragmentos de ADN o ARN linealizados que, cuando se asocian con los elementos de control y enzimas apropiados, pueden transcribirse o expresarse en la célula hospedadora para proporcionar funciones accesorias.

15 En un modo de realización, las secuencias de ácido nucleico que proporcionan las funciones accesorias se pueden obtener de fuentes naturales, como por ejemplo el genoma de una partícula de adenovirus, o se pueden construir utilizando métodos sintéticos o recombinantes conocidos en la técnica. A este respecto, se han estudiado ampliamente las funciones accesorias derivadas de adenovirus y se han identificado y caracterizado parcialmente varios genes de adenovirus relacionados con las funciones accesorias. Específicamente, se cree que las regiones de gen adenoviral temprano E1a, E2a, E4, VAI RNA y posiblemente E1b participan en el proceso accesorio. Se han descrito las funciones accesorias derivadas de herpesvirus. Se han descrito también las funciones accesorias derivadas de virus variolovacunal.

25 En un modo de realización, como consecuencia de la infección de la célula hospedadora con un virus auxiliar, o transfección de la célula hospedadora con un vector de función accesoría, se expresan funciones accesorias que transactivan la construcción de auxiliar de AAV para producir proteínas Rep y/o Cap de AAV. Los productos de expresión de Rep recortan el ADN recombinante (incluyendo el ADN de interés) del vector de expresión de AAV. Las proteínas Rep también sirven para duplicar el genoma de AAV. Las proteínas Cap expresadas se ensamblan en cápsides y el genoma de AAV recombinante se empaqueta en las cápsides. De este modo, se asegura la replicación de AAV productiva y se empaqueta el ADN en viriones de rAAV.

30 En un modo de realización, tras la replicación de AAV recombinante, se pueden purificar viriones de rAAV en la célula hospedadora aplicando diversos métodos de purificación convencionales, tales como gradientes de CsCl. Asimismo, si se emplea infección para expresar las funciones accesorias, se puede inactivar el virus auxiliar residual aplicando métodos conocidos. Por ejemplo, se puede inactivar el adenovirus por calentamiento a temperaturas de aproximadamente 60 °C durante, p.ej., 20 minutos o más. Este tratamiento inactiva eficazmente únicamente el virus auxiliar ya que AAV es extremadamente termoestable, mientras que el adenovirus auxiliar es térmicamente inestable. Los viriones de rAAV resultantes quedan listos entonces para su uso para el suministro de ADN al SNC (p.ej., a la cavidad craneal) del sujeto.

40 Entre los métodos de suministro de vectores virales se incluyen, sin limitarse sólo a ellos, las vías intraarterial, intramuscular, intravenosa, intranasal y oral. Generalmente, los viriones de rAAV se pueden introducir en las células del SNC utilizando técnicas de transducción *in vivo* o *in vitro*. Si se transducen *in vitro*, se extirpará la célula receptora deseada del sujeto, se transducirá con los viriones rAAV y se reintroducirá en el sujeto. Como alternativa, se pueden utilizar células singénicas y xenogénicas cuando dichas células no generen una respuesta inmune inapropiada en el sujeto.

50 Se han descrito métodos adecuados para suministrar e introducir células transducidas a un sujeto. Por ejemplo, se pueden transducir células *in vitro* combinando viriones AAV recombinantes con células del SNC, p.ej. en medios apropiados, y realizar la exploración de las células que albergan el ADN de interés, dicha exploración se puede realizar utilizando técnicas convencionales, tales como transferencia Southern y/o PCR, o utilizando marcadores seleccionables. A continuación, se pueden formular las células transducidas en composiciones farmacéuticas, como injerto, inyección intramuscular, intravenosa, subcutánea e intraperitoneal.

55 En un modo de realización, para el suministro *in vivo*, se formulan los viriones rAAV en composiciones farmacéuticas y se administrarán por lo general por vía parenteral, p.ej. por inyección intramuscular directamente en el músculo esquelético cardíaco o por inyección en el SNC:

60 En un modo de realización, los vectores virales se liberan al SNC por sistemas de suministro potenciados por convección (CED) que pueden suministrar de manera eficaz los vectores virales, p. ej. AAV, a lo largo de regiones grandes del cerebro del sujeto (p. ej. cuerpo estriado y/o córtex). Tal como se describe con detalle y se ilustra más adelante, estos métodos son adecuados para diversos vectores virales, tales como, por ejemplo, vectores de AAV que portan genes terapéuticos (p.ej. ARNip).

65 Para liberar vectores virales, puede ser apropiado cualquier dispositivo de suministro potenciado por convección. En un modo de realización, el dispositivo es una bomba osmótica o una bomba de infusión. Tanto la bomba osmótica como la bomba de infusión están disponibles en el comercio por diferentes proveedores, como por ejemplo Alzet

Corporation, Hamilton Corporation, Aiza, Inc., Palo Alto, Calif.). Normalmente, un vector viral se suministra por CED del siguiente modo. Se inserta un catéter, cánula u otro dispositivo de inyección en el tejido del SNC del sujeto elegido. Teniendo en cuenta las enseñanzas del presente documento, los expertos en la técnica podrán determinar fácilmente qué área general del SNC es una diana apropiada. Por ejemplo, cuando se suministra un vector AAV que codifica un gen terapéutico para tratar PD, el cuerpo estriado es un área del cerebro adecuada para dirigirlo. Se dispone de mapas estereotácticos y dispositivos de localización, por ejemplo de ASI Instruments, Warren, Mich. La localización se puede llevar a cabo utilizando mapas anatómicos obtenidos por imágenes TC y/o RM del cerebro del sujeto para ayudar a guiar el dispositivo de inyección hacia la diana elegida. Asimismo, dado que los métodos descritos en el presente documento se pueden poner en la práctica de manera que áreas relativamente extensas del cerebro recojan los vectores virales, se necesitan menos cánulas de infusión. Teniendo en cuenta que las complicaciones quirúrgicas están relacionadas con el número de penetraciones, los métodos que se describen en el presente documento también sirven para reducir los efectos secundarios observados con las técnicas de suministro convencionales.

En un modo de realización de la divulgación, las composiciones farmacéuticas comprenderán suficiente material genético como para producir una cantidad terapéuticamente efectiva del ácido nucleico de interés, es decir, una cantidad suficiente para reducir o mejorar los síntomas de la patología en cuestión o una cantidad suficiente para conferir el efecto deseado. Las composiciones farmacéuticas también tendrán un contenido en excipiente farmacéuticamente aceptable. Entre dichos excipientes se incluye cualquier agente farmacéutico que no induzca por sí mismo la producción de anticuerpos nocivos para el individuo que recibe la composición y que se puedan administrar sin una toxicidad indebida. Entre los excipientes farmacéuticamente aceptables se incluyen, sin limitarse solo a ellos, sorbitol, Tween80 y líquidos como agua, solución salina, glicerol y etanol. Se pueden incluir en él sales farmacéuticamente aceptables, como por ejemplo sales de ácido mineral, tales como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos, sulfatos y similares; y sales de ácidos orgánicos, tales como, acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos y similares. Adicionalmente, pueden estar presentes sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes y emulsionantes, sustancias tampón de pH y similares. En Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., N.J. 1991), se puede encontrar una explicación completa de los excipientes farmacéuticamente aceptables.

Tal como es obvio para los expertos en la técnica, a la luz de las enseñanzas de la presente memoria descriptiva, la cantidad efectiva del vector viral que se debe añadir se puede determinar empíricamente.

La administración se puede llevar a cabo en una dosis, de manera continua o intermitente, durante todo el tratamiento. Los métodos para determinar los medios y las dosis de administración más efectivos son conocidos por los expertos en la técnica y variarán según el vector viral, la composición de la terapia, las células diana y el sujeto que se vaya a tratar. Se pueden llevar a cabo administraciones únicas o múltiples, siendo el médico tratante quien seleccione el nivel y el patrón de las dosis.

Debe entenderse que podría expresarse más de un transgén a través del vector viral suministrado. Como alternativa, también se pueden suministrar al SNC vectores por separado, expresando cada uno de ellos transgenes diferentes, tal como se describe en el presente documento. Asimismo, también se pretende que los vectores virales suministrados a través de los métodos de la presente divulgación se combinen con otras composiciones y terapias adecuadas.

Métodos para introducir material genético en células

El material genético exógeno (p.ej. un ADNc que codifica una o más proteínas terapéuticas) se introduce en la célula *ex vivo* o *in vivo* a través de métodos de transferencia genética, tales como la transfección o transducción, para proporcionar una célula genéticamente modificada. Los expertos en la técnica conocen varios vectores de expresión (es decir, vehículos para facilitar el suministro de material genético exógeno en una célula diana).

Tal como se utiliza en el presente documento "transfección de células" se refiere a la adquisición que hace una célula de material genético nuevo mediante la incorporación de ADN añadido. Por lo tanto, transfección se refiere a la inserción de ácido nucleico en la célula utilizando métodos físicos o químicos. Los expertos en la técnica conocen diferentes técnicas de transfección entre las que se incluyen: co-precipitación de ADN con fosfato cálcico; DEAE-dextrano; electroporación; transfección mediada por liposoma catiónico; y bombardeo de micropartículas facilitado por partículas de tungsteno. Otro posible método de transfección es la co-precipitación de ADN con fosfato de estroncio.

En contraposición, "transducción de células" se refiere al proceso de transferir ácido nucleico a una célula utilizando un virus de ADN o ARN. Un virus de ARN (es decir, un retrovirus) para transferir un ácido nucleico a una célula se refiere en el presente documento a un retrovirus quimérico de transducción. Se incorpora el material genético exógeno dentro del retrovirus en el genoma de la célula transducida. Una célula que ha sido transducida con un virus de ADN quimérico (p.ej. un adenovirus que lleva un ADNc que codifica un agente terapéutico) no tendrá el material genético exógeno incorporado en su genoma pero será capaz de expresar material genético exógeno que se retiene extracromosómicamente dentro de la célula.

Normalmente, el material genético exógeno incluye el gen heterólogo (normalmente en forma de un ADNc que comprende los exones que codifican la proteína terapéutica) junto con un promotor para controlar la transcripción del gen nuevo. El promotor tiene característicamente una secuencia de nucleótidos específica necesaria para iniciar la transcripción. Opcionalmente, el material genético exógeno incluye además secuencias adicionales (es decir, potenciadores) necesarios para obtener la actividad de transcripción del gen deseada. Para los fines de la presente explicación un “potenciador” es simplemente cualquier secuencia de ADN no traducida que funciona contigua a la secuencia de codificación (en *cis*) para cambiar el nivel de transcripción basal dictado por el promotor. Se puede introducir el material genético exógeno en el genoma de la célula inmediatamente en dirección 3' desde el promotor de manera que el promotor y la secuencia de codificación están operativamente unidos para permitir la transcripción de la secuencia de codificación. Un vector de expresión retroviral puede incluir un elemento promotor exógeno para controlar la transcripción del gen exógeno insertado. Dichos promotores exógenos incluyen promotores tanto constitutivos como inducibles.

Los promotores constitutivos de origen natural controlan la expresión de las funciones esenciales de la célula. Como resultado, un gen bajo el control de un promotor constitutivo se expresa en todas las condiciones de crecimiento celular. Entre los ejemplos de promotores constitutivos se incluyen los promotores para los siguientes genes que codifican determinadas funciones constitutivas o de “mantenimiento”: hipoxantina fosforribosil transferasa (HPRT), dihidrofolato reductasa (DHFR), adenosin desaminasa, fosfoglicerato cinasa (PGK), piruvato cinasa, fosfoglicerato mutasa, el promotor de actina y otros promotores constitutivos conocidos por los expertos en la técnica. Por otra parte, muchos promotores virales funcionan constitutivamente en células eucarióticas. Entre ellos se incluyen: promotores tempranos y tardíos de SV40; terminaciones repetidas largas (LTR) de virus de la leucemia de ratón de Moloney y otros retrovirus; y el promotor de timidina cinasa de virus del Herpes simple, entre otros. Por consiguiente, se puede utilizar cualquier promotor constitutivo antes referido para controlar la transcripción de un inserto de gen heterólogo.

Los genes que están bajo el control de promotores inducibles se expresan solamente, o en mayor grado, en presencia de un agente de inducción (p.ej. la transcripción bajo el control del promotor de metalotioneína se aumenta en gran medida en presencia de determinados iones metálicos). Los promotores inducibles incluyen elementos de respuesta (ER) que estimulan la transcripción cuando se unen sus factores de inducción. Por ejemplo, existen ER para factores de suero, hormonas esteroideas, ácido retinóico y AMP cíclico. Pueden seleccionarse promotores que contienen un ER concreto para obtener una respuesta inducible y en algunos casos, el propio ER puede unirse a un promotor diferente, confiriendo así inducibilidad al gen recombinante. Por lo tanto, al seleccionar el promotor apropiado (constitutivo frente a inducible; fuerte frente a débil), es posible controlar tanto la existencia como el nivel de expresión de un agente terapéutico en la célula genéticamente modificada. Si el gen que codifica el agente terapéutico está bajo el control de un promotor inducible, el suministro del agente terapéutico *in situ* se desencadena por exposición *in situ* de la célula genéticamente modificada en condiciones que permitan la transcripción del agente terapéutico, p.ej. por inyección intraperitoneal de inductores específicos de los promotores inducibles que controlan la transcripción del agente. Por ejemplo, la expresión *in situ* a través de células genéticamente modificadas de un agente terapéutico codificado por un gen bajo el control de un promotor de metalotioneína, se potencia poniendo en contacto las células genéticamente modificadas con una solución que contiene los iones metálicos apropiados (es decir, de inducción) *in situ*.

Por consiguiente, la cantidad de agente terapéutico que se suministra *in situ* se regula controlando factores como: (1) la naturaleza del promotor utilizado para dirigir la transcripción del gen insertado), (es decir, si el promotor es constitutivo o inducible, fuerte o débil); (2) el número de copias del gen exógeno que se insertan en la célula; (3) el número de células transducidas/transfectadas que se administran (p.ej. se implanta) al paciente; (4) el tamaño del implante (p.ej. sistema de expresión de injerto o encapsulamiento); (5) número de implantes; (6) período de tiempo que se dejan en el lugar las células transducidas/transfectadas o implantes; y (7) la tasa de producción del agente terapéutico a través de la célula genéticamente modificada. Se considera que la selección y optimización de estos factores para suministrar una dosis terapéuticamente eficaz de un agente terapéutico de un agente terapéutico concreto entra dentro del alcance de la especialización en la técnica sin una experimentación indebida, teniendo en cuenta los factores que se han descrito y el perfil clínico del paciente.

Además de al menos un promotor y al menos un ácido nucleico que codifica el agente terapéutico, el vector de expresión puede incluir un gen de selección, por ejemplo, un gen de resistencia a neomicina, para facilitar la selección de células que han sido transfectadas o transducidas con el vector de expresión. Como alternativa, las células se transfectan con dos o más vectores de expresión, al menos un vector que contiene el (los) gen(es) que codifican el (los) agente(s) terapéutico(s), conteniendo el otro vector un gen de selección. Se considera que la selección de un promotor, potenciador, gen de selección y/o secuencia de señal (descrita más adelante) entra dentro del alcance de la especialización en la técnica sin una experimentación indebida.

Se puede dirigir el agente terapéutico para suministrarlo en una localización extracelular, intracelular o de membrana. Si es deseable que el producto génico sea secretado desde las células, se diseña el vector de expresión para que incluya una secuencia de “señal” de secreción apropiada para secretar el producto génico terapéutico desde la célula al entorno extracelular. Si es deseable que el producto génico se retenga dentro de la célula, se omite la secuencia de señal de secreción. De manera similar, se puede construir el vector de expresión para incluir

“secuencias de señal de retención” para el anclaje del agente terapéutico dentro de la membrana del plasma celular. Por ejemplo, todas las proteínas de la membrana tienen regiones transmembrana hidrófobas que detienen la translocación de la proteína en la membrana y no permiten que se secrete la proteína. Se considera que la construcción de un vector de expresión que incluye secuencias de señal para dirigir un producto génico a una localización en particular entra dentro del alcance de la especialización en la técnica sin una experimentación indebida.

La explicación que se expone a continuación trata de las diversas utilidades de la presente divulgación. Por ejemplo, la presente divulgación tiene utilidad como sistema de expresión adecuado para la destoxificación de toxinas intra- y/o extracelulares *in situ*. Al unir u omitir la secuencia de señal apropiada a un gen que codifica un agente terapéutico capaz de detoxificar una toxina, el agente terapéutico se puede dirigir para su suministro en un entorno extracelular, la membrana de plasma celular o una localización intracelular. En un modo de realización, el material genético exógeno que contiene un gen que codifica el agente terapéutico de destoxificación intracelular, incluye además secuencias que codifican receptores de superficie para facilitar el transporte de toxinas extracelulares en la célula, en la que se pueden detoxificar intracelularmente gracias al agente terapéutico. Como alternativa, se pueden modificar genéticamente las células para expresar el agente terapéutico destoxificante anclado dentro de la membrana de plasma celular, de manera que la porción activa se extienda hacia el entorno extracelular. La porción activa del agente terapéutico unido a membrana destoxifica las toxinas que están presentes en el entorno extracelular.

Además de los agentes terapéuticos descritos, algunos de los cuales se dirigen para retención intracelular, la presente divulgación abarca también agentes destinados a suministrarse al entorno extracelular y/o agentes destinados a anclarse en la membrana plasmática celular.

La selección y optimización del vector de expresión en particular para expresar un producto génico específico en una célula aislada se lleva a término obteniendo el gen, potencialmente con una o más regiones de control apropiadas (p.ej. promotor, secuencia de inserción); preparando una construcción de vector que comprende el vector en el que se inserta el gen; transfectando o transduciendo células de cultivo *in vitro* con la construcción de vector; y determinando si el producto génico está presente en las células cultivadas. En ciertos modos de realización, se utiliza un virus de la familia de virus adenoasociados. En ciertos modos de realización, se utiliza un vector de expresión para genoterapia basada en AAV2, AAV4 y/o AAV5.

Por lo tanto, tal como será obvio para los expertos en la técnica, se dispone de varios vectores de expresión virales adecuados para transferir material genético exógeno a las células. La selección de un vector de expresión apropiado para que exprese un agente terapéutico para una afección en particular susceptible de genoterapia por sustitución y la optimización de las afecciones por inserción de un vector de expresión seleccionado en la célula, entran dentro del alcance de la especialización en la técnica sin una experimentación indebida.

En un modo de realización alternativo, el vector de expresión se encuentra en forma de plásmido, que es transfectado a las células diana a través de uno entre diversos métodos: físicos (p.ej. microinyección, electroporación, carga de raspaduras, bombardeo de micropartículas) o por captación celular como complejo químico (p.ej. co-precipitación con calcio o estroncio, formación de complejos con lípidos, formación de complejos con ligando). Existen varios productos comerciales disponibles para la formación de complejo con liposoma catiónico, entre los que se incluyen Lipofectin™ (Gibco-BRL, Gaithersburg, Md.) and Transfectam™ (ProMega, Madison, Wis.). Sin embargo, la eficacia de la transfección a través de estos métodos depende en gran medida de la naturaleza de la célula diana y, por consiguiente, deben optimizarse las condiciones para una transfección óptima de los ácidos nucleicos en células utilizando los procedimientos que se han mencionado. Dicha optimización entra dentro del alcance de la especialización en la técnica ordinaria sin necesidad de una experimentación indebida.

La presente divulgación proporciona también varios métodos para fabricar y utilizar las células genéticamente modificadas descritas. Tal como se utiliza en el presente documento, el término “aislado” significa una célula o una pluralidad de células que han sido retiradas de su localización *in vivo* natural. Los expertos en la técnica conocen métodos para extraer células de un paciente, así como métodos para mantener las células aisladas en cultivo.

La presente divulgación proporciona también métodos para modificar genéticamente células de un receptor mamífero *in vivo*. De acuerdo con un modo de realización, el método comprende introducir un vector de expresión para expresar un producto génico heterólogo en células del receptor mamífero *in situ*, por ejemplo, por inyección del vector en el receptor.

En un modo de realización, la preparación de las células genéticamente modificadas contiene una cantidad de células suficiente para suministrar una dosis terapéuticamente eficaz del agente terapéutico al receptor *in situ*. La determinación de una dosis terapéuticamente eficaz de un agente terapéutico específico para una afección conocida entra dentro del alcance de la especialización en la técnica sin necesidad de una experimentación indebida. Por lo tanto, para determinar la dosis eficaz, el experto en la técnica tendrá en cuenta la afección del paciente, la gravedad de la afección, así como los resultados de los estudios clínicos del agente terapéutico específico que se administre.

Si las células genéticamente modificadas aún no están presentes en un vehículo farmacéuticamente aceptable, se disponen en dicho vehículo antes de su administración al receptor. Entre dichos vehículos farmacéuticamente aceptables se incluyen, por ejemplo, solución salina isotónica y otros tampones, según sea apropiado para el paciente y para la terapia.

Se puede introducir más de un gen recombinante en cada célula genéticamente modificada en el mismo o en diferentes vectores, dando cabida así a la expresión de múltiples agentes terapéuticos en una sola célula.

Ejemplo 1 Tratamiento de trastornos del Sistema nervioso central a través de los endotelios vasculares

Las enfermedades por depósito lisosomal (EDL) constituyen una amplia clase de trastornos metabólicos hereditarios. La mayoría de las EDL son causadas por deficiencias de la enzima lisosomal que conducen al daño del órgano y, frecuentemente, a la degeneración del sistema nervioso central (SNC). Los trabajos anteriores con modelos roedores de las enfermedades por depósito lisosomal (TDL) han demostrado ser prometedoras al abordar las manifestaciones sistémicas de estos trastornos, o bien por sustitución enzimática o bien por trasplante de médula ósea para receptores adultos. Si bien la sustitución enzimática es eficaz para una enfermedad periférica, el tratamiento del SNC sigue siendo un reto, ya que las enzimas suministradas por vía intravenosa no cruzan la barrera hematoencefálica (BHE). Los estudios de genoterapia en modelos animales con EDL requieren desde hace tiempo por tanto la inyección intracraneal directa de vectores virales. La vasculatura cerebral constituye una diana atractiva para genoterapia, dada su extensa red por todo el cerebro a la que se puede co-optar potencialmente para suministrar enzimas terapéuticas, pero aún no se dispone de un vector que se dirija a la vasculatura. Los autores de la invención utilizaron presentación de fagos *in vivo* para identificar péptidos que se unen al endotelio vascular de un modelo murino de mucopolisacaridosis tipo VII (MPS VII), una EDL prototípica causada por deficiencia de β -glucuronidasa. En los ratones con deficiencia de β -glucuronidasa, la inhibición del deterioro cognitivo requirió que el tratamiento se iniciara en el período neonatal sistémicamente antes del cierre de la barrera hematoencefálica, o directamente al cerebro. La inserción de péptidos recién identificados en la cápside del virus adenoasociado tuvo como resultado virus que expresaban la enzima terapéutica desde las células del endotelio vascular. Como dato importante, la inyección intravenosa del virus modificado recuperó los déficits del SNC en los ratones MPS VII. Estos resultados demuestran por primera vez la eficacia terapéutica basada en el redireccionamiento del tropismo viral a un sitio de la enfermedad crítico.

Los estudios anteriores han demostrado que las enzimas lisosomales solubles se segregan en parte fuera de la célula y pueden sufrir endocitosis mediada por receptor manosa-6-fosfato y clasificación para el lisosoma mediante células vecinas en un proceso denominado corrección cruzada. Los autores de la invención han lanzado la hipótesis de que la expresión de enzimas lisosomales desde endotelios vasculares del cerebro podría llevar a una corrección cruzada global del cerebro en virtud de la densa distribución de la vasculatura del SNC en el parénquima cerebral. El área superficial de la microvasculatura del cerebro es de aproximadamente $100 \text{ cm}^2/\text{g}$ de tejido. La transducción de células endoteliales vasculares permite la secreción apical y basolateral de agentes terapéuticos como β -glucuronidasa. Por tanto, los autores de la invención han lanzado la hipótesis de que la secreción basolateral puede exponer las neuronas subyacentes y la glía a suficiente enzima recombinante para la terapia (Fig. 1A y 1B). Actualmente, ningún AAV se dirige específicamente o eficazmente al endotelio del cerebro. La mayoría de los AAV son recogidos por el hígado tras el suministro periférico.

Los autores de la presente invención han diseñado AAV que se modifican para dirigirse al endotelio cerebral tras su suministro sistémico. Para generar un virus adenoasociado (AAV) que se dirige a la vasculatura cerebral, los autores de la invención utilizaron primero selección de presentación de fagos *in vivo* para identificar motivos de péptido que se unen preferencialmente a la vasculatura del cerebro. Se inyectó la biblioteca de presentación de fagos por vía intravenosa en ratones de tipo silvestre y MPS VII, y posteriormente se aisló la microvasculatura cerebral a lo largo del fago unido. A continuación, se amplificó el fago aislado y se reinyectó y, tras cinco rondas de dicha selección *in vivo*, la secuencia de ADN del fago recuperado puso de manifiesto un enriquecimiento de motivos de péptido diferenciados con respecto a la biblioteca de fagos inicial. Como dato interesante, los motivos enriquecidos de los ratones de tipo silvestres fueron todos ellos distintos de los de los ratones con MPS VII, lo que hace pensar en un proceso de remodelación vascular en los ratones enfermos. Este método se puede utilizar para identificar motivo(s) que son específicos de otras patologías.

En los ratones de tipo silvestre, se identificaron los motivos de péptido PxxPS, SPxxP, TLH y QSxY en 19 de los clones (Fig. 2A). De ellos, destacaron especialmente dos, concretamente DSPAHPS y GWTLHNK. DSPAHPS contenía tanto motivos PxxPS como SPxxP, y GWTLHNK fue representado tres veces en la población de fagos extraída como muestra. En los ratones con MPS VII, se identificaron tres motivos de péptido - LxSS, PFxG y SlxA- (Fig. 2B). Para confirmar la afinidad de estos fagos para la vasculatura del cerebro, se reinyectó individualmente cada fago por vía intravenosa en ratones de tipo silvestre y con MPSVII y se comparó la cantidad de fagos recuperados de la vasculatura del cerebro con la de un fago de control sin inserto de péptido o la biblioteca de fago no seleccionado original. En los ratones de tipo silvestre, la recuperación del fago que contenía DSPAHPS y GWTLHNK fue más alta que las demás (Fig. 2C), en correspondencia con los resultados de selección iniciales. En los ratones con MPS VII, los péptidos WPFYGTP y LPSSLQK se recuperaron en mayor número que los demás fagos seleccionados (Fig. 2D). En correspondencia con los resultados de selección, cada uno de los fagos

seleccionados se acumuló en el cerebro más allá de los niveles observados para los controles.

Se generaron AAV modificados con péptido insertando los péptidos identificados de la selección de presentación de fagos en la cápside de AAV2. Se insertaron los péptidos en la posición 587 de la proteína de la cápside de VP3 para producir clones AAV-Conector(AAAAA), AAV-TLH(GWTLHNK), AAV-PPS(DSPAHP), AAV-PFG(WPFYGT) y AAV-LSS(LPSSLQK). AAV-WT (sin inserto) sirvió como virus de control. El sitio 587 está localizado en un dominio de la proteína de la cápside de VP3 relacionado con la unión de AAV2 con su receptor principal, heparán sulfato proteoglicano (HSPG) y la inserción de péptidos en este sitio puede alterar el tropismo de AAV sin comprometer la viabilidad del virus. Las proteínas de cápside modificadas empaquetaron genomas de vector de AAV con títulos genómicos comparables a los de los virus de tipo silvestre. Para valorar el tropismo de tejido del AAV modificado con péptido, los investigadores cuantificaron genomas virales por RT-PCR en el hígado y el cerebro tras inyecciones en la vena de la cola del virus. Se inyectaron AA-PPS y AAV-TLH en ratones de tipo silvestre y se inyectaron AAV-PFG y AAV-LSS en ratones con MPS VII. En el esquema 1, a continuación, se representa un diseño del AAV modificado con péptido.

Esquema 1

1. Secuencia de cápside de tipo silvestre de AAV2

587 588
5'-AGA GGC AAC AGA CAA GCA-3' (SEQ ID NO: 36)
R G N R Q N (SEQ ID NO: 37)

2. Secuencia modificada de estructura de la cápside

NotI Ascl
5'-AGA GGC AAC GCG GCC GCC TAG GCG CGC CAA GCA-3' (SEQ ID NO: 38)
R G N A A A parada A R Q N (SEQ ID NO: 39)

3. Inserción de péptido X en el sitio NotI y Ascl

R G N A A A X A A R Q N (SEQ ID NO: 40)

En la SEQ ID NO: 35, a continuación, se representa la secuencia de cápside de tipo silvestre AAV2. Aparece en cursiva un ejemplo de aminoácidos dirigidos a la vasculatura del cerebro de ratones MPS VII y los aminoácidos subrayados son espaciadores.

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGP
FNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADA EFQERLKEDTSF
GGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVK TAPGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQP
ARKRLNFGQTDADSVDPQPLGQPPAAPSGLGTNTMATGSGAPMADNNEGADG
VGNSSGNWHCDSTWMGDRVITSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGY
STPWGYFDNRFHCHFSRWDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTT
IANLNTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAV
GRSSFYCLEYFPSQMLRTGNFTFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYY
LSRTNTPSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYS
WTGATKYHLNGRDSLVPNGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEK
VMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGNA^{AAA}WPFYGT^{PAAR}QAATADVNTQG
VLPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPA
NPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS^{KRW}NP^{EIQY}TSNYN^{KSV}NVDF
TVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL* (SEQ ID NO:35)

Se inyectó AAV-WT como control en ambas cepas de ratón. Cuatro semanas después de la inyección, se observó transducción de AAV-WT predominantemente en el hígado, no detectándose ningún virus en el cerebro ni de los ratones de tipo silvestre ni de los MPS VII tras la administración sistémica (Figs. 3A and 3B). En contraste, la administración intravenosa de AAV modificado con péptido tuvo como resultado una significativa acumulación de

virus en el cerebro y niveles más bajos en el hígado (Figs. 3A and 3B). El tropismo del AAV modificado con péptido se confirmó además por la expresión del gen indicador. Se inyectó el AAV modificado con péptido con el promotor de citomegalovirus (CMV) que acciona la expresión de eGFP (AAV-PPS) o β -glucuronidasa (AAV-PFG) en la vena de la cola de ratones de tipo silvestre y MPS VII, respectivamente. En correspondencia con los resultados de la RT-PCR, 4 semanas después de la inyección, se detectó la expresión eGFP y β -glucuronidasa en el cerebro de los ratones de tipo silvestre y con MPS VII, respectivamente, y no se observó en los ratones con infusión de AAV-WT. Asimismo, se co-localizó β -glucuronidasa con CD31, un marcador del endotelio vascular, lo que confirmó que el virus se dirige al endotelio cerebral. El desplazamiento de tropismo de estos AAV modificados va acompañado de una pérdida de afinidad a heparán sulfato proteoglicano. En un ensayo de unión heparina-agarosa, AAV-TLH, AAV-PPS, AAV-PFG y AAV-LSS perdieron todos ellos la capacidad para unirse a heparán sulfato. Estos resultados demuestran que los péptidos identificados concurrentemente por selección de presentación de fagos redirigieron con éxito el tropismo de AAV al endotelio vascular cerebral.

Por tanto, en determinados modos de realización, se inserta la secuencia de aminoácidos que dirige el vector al endotelio vascular cerebral, tal como se ha explicado. En ciertos modos de realización, dicha secuencia de aminoácidos puede consistir o comprender TLH (SEQ ID NO: 3), QSXY (SEQ ID NO: 4), LXSS (SEQ ID NO: 21), o SIXA (SEQ ID NO: 23), tal como se expresa en una orientación amino a carboxi o en la orientación carboxi a amino. En ciertos modos de realización, dicha secuencia puede consistir o comprender PYFPSLS (SEQ ID NO:5), YAPLTPS (SEQ ID NO:6), PLSPSAY (SEQ ID NO:7), DSPAHP (SEQ ID NO:8), GTPTHPS (SEQ ID NO:9), PDAPSNH (SEQ ID NO:10), TEPHWPS (SEQ ID NO:11), SPPLPK (SEQ ID NO:12), SPKPPP (SEQ ID NO:13), NWSPWDP (SEQ ID NO:14), DSPAHP (SEQ ID NO:15), GWTLHNK (SEQ ID NO:16), KIPPTLH (SEQ ID NO:17), ISQTLHG (SEQ ID NO:18), QSFYILT (SEQ ID NO: 19), TTQSEYG (SEQ ID NO:20), MLVSSPA (SEQ ID NO:24), LPSSLQK (SEQ ID NO:25), PPLLKSS (SEQ ID NO:26), PXKLDSS (SEQ ID NO:27), AWTLASS (SEQ ID NO:28), WPFYGTP (SEQ ID NO:29), GTFPFLG (SEQ ID NO:30), GQVPFMG (SEQ ID NO:31), ANFSILA (SEQ ID NO:32), GSIWAPA (SEQ ID NO:33), o SIAASFS (SEQ ID NO:34), tal como se expresa en una orientación amino a carboxi o en la orientación carboxi a amino.

El suministro de las enzimas terapéuticas al sistema nervioso central continúa siendo un importante reto en el tratamiento de trastornos por depósito lisosomal neuropáticos ya que la barrera hematoencefálica impide efectivamente la entrada de enzimas desde la circulación sistémica. Al respecto, los investigadores ensayaron la eficacia terapéutica de dirigir al endotelio vascular cerebral el AAV modificado en el modelo murino de MPS VII. Dicho ratón con deficiencia en β -glucuronidasa presenta características distintivas de la enfermedad MPS VII incluyendo disfunción neurológica y por depósito lisosomal y es un modelo de investigación probado para investigar nuevas terapias para enfermedades por depósito lisosomal (Vogler, C. et al., *Pediatr Res* 49, 342-8 (2001)). Se inyectó AAV-PFG o AAV-WT que expresaban β -glucuronidasa en la vena de la cola a ratones con MPS VII de 6 semanas de vida, cuando aparecieron por primera vez depósitos de almacenamiento lisosomal en el ratón. 6 semanas después de la inyección, se investigaron el almacenamiento lisosomal y la distensión celular en el cerebro por microscopía de campo claro. Los ratones MPS VII tratados con AAV-PG presentaron una reducción de los niveles de depósito lisosomal en relación con los ratones que recibieron AAV-WT, que retuvieron los depósitos lisomales en múltiples regiones del SNC, incluyendo el córtex cerebral, el hipocampo, el cuerpo estriado y el cerebelo (Figs. 4A-4H). Dado que los virus modificados con péptido de la presente divulgación se dirigen al endotelio, la corrección de la patología neuronal sugiere que las células endoteliales secretan β -glucuronidasa basolateralmente con la subsiguiente corrección cruzada de las neuronas adyacentes. La corrección de neuropatología en múltiples estructuras por toda la extensión rostral-caudal del cerebro indica una amplia diseminación de enzima terapéutica.

Los ratones con MPS VII desarrollan un deterioro progresivo de la función neuronal tal como se mide utilizando un ensayo de laberinto de agua de Morris, una cámara de comportamiento y adquisición repetida (RAPC), y ensayos de condicionamiento al miedo contextual. Para examinar la recuperación funcional tras el suministro intravenoso de PM-AAV, los investigadores de la presente divulgación utilizaron el ensayo de condicionamiento al miedo contextual, un ensayo que examina la integridad de varias regiones del cerebro incluyendo el hipocampo y la amígdala. Primero, se condicionaron los ratones con descargas eléctricas en las patas en la cámara de ensayo (contexto 1). Un día después, se midió la conducta de petrificación inducida por el miedo cuando los ratones fueron ubicados o bien en el contexto 1 o bien en una cámara modificada con señales olfativas, táctiles y visuales nuevas (contexto 2). Los ratones de control fueron capaces de distinguir el contexto 1 del contexto 2, tal como queda evidenciado por la disminución de la conducta de paralización cuando se ubican en el contexto 2. Los ratones con MPS VII tratados con AAV-WT- β -glucuronidasa, en cambio, presentaron un menor cambio en la conducta de paralización, lo que sugiere la persistencia de los déficits de memoria. Sin embargo, los ratones con MPS VII tratados con AAV-PFG- β -glucuronidasa, presentaron una conducta similar a la de los ratones heterocigotos (Fig. 4I). La inyección intravenosa de PM-AAV y la expresión posterior de β -glucuronidasa desde el endotelio cerebral recuperó estos déficits del SNC de los ratones con MPS VII.

La enzima de la que hay deficiencia en las MPS VII, β -glucuronidasa, cataliza la degradación de glucosaminoglicanos (GAG) incluyendo heparán sulfato y el condroitín sulfato. En el estado patológico, el catabolismo de estas moléculas se bloquea y tiene como resultado la acumulación lisosomal. Los investigadores han lanzado la hipótesis de que el AAV modificado con péptido podría interactuar con las glucoproteínas que contienen

GAG que se acumulan en las superficies endoteliales. Para abordar dicha hipótesis, se midió la capacidad de AAV-PFG de unirse a la vasculatura cerebral purificada de ratones con MPS VII en presencia y ausencia de la enzima condroitinasa ABC. El tratamiento enzimático de la vasculatura de ratones con MPS VII abolió la capacidad de unión a PFG-AAV (Fig. 4J). Se demostró además que un exceso de condroitín sulfato en la reacción de unión podía competir eliminando la unión de FG-AAV a la vasculatura (Fig 4K). Estos resultados sugieren que la unión del virus modificado de la presente divulgación (AAV-PFG) al endotelio vascular del cerebro requiere condroitín sulfato.

Como prueba del principio de que el éxito de los experimentos de selección es aplicable a modelos patológicos más allá de ratones con MPS VII, los autores de la presente divulgación llevaron a cabo el mismo experimento en un modelo de ratón con lipofuscinosis ceroide neuronal infantil tardía. Dicho ratón carece de la expresión de la enzima lisosomal tripeptidil peptidasa I (TPP1), y recapitula muchos rasgos patológicos de la enfermedad humana. Tras cinco rondas de selección *in vivo*, emergió un solo péptido dominante -GMNAFRA (SEQ ID NO: 41) (Fig. 5A). Como en el caso anterior, se produjo un AAV modificado con péptido que expresaba TPP1 y se inyectó por vía intravenosa en ratones con deficiencia de TPP1. Tres semanas después de la inyección, los ratones que recibieron PM-AAV presentaron expresión de TPP1 en pequeños vasos del córtex cerebral, el mesencéfalo y el cerebelo, mientras los ratones que recibieron inyecciones de AAV de tipo silvestre no presentaron ningún manchado de TPP1 (Figs. 5B-5D). El péptido identificado en este experimento fue distinto de los identificados en los ratones de tipo silvestre o con MPS VII, lo que sugiere una vez más un proceso de remodelación vascular específico de la enfermedad. Se llevó a cabo también un ensayo *in vitro* para determinar la actividad de TPP1 en varios tejidos tras inyección en la vena de la cola de virus modificado con péptido (Fig. 5E). Los niveles de actividad se expresaron en relación con el control heterocigoto.

La capacidad de alterar sistemáticamente el tropismo viral se ha empezado a desarrollar como una poderosa técnica en genoterapia. A este respecto, los investigadores de la presente divulgación redireccionaron AAV a la vasculatura del cerebro como medio de diseminación de la enzima terapéutica y han demostrado por primera vez una corrección de enfermedades del SNC en los ratones con MPS VII tras el suministro periférico de vectores de genoterapia.

Por lo tanto, el suministro periférico de AAV modificados con péptido dirigidos al cerebro trató la patología y mejoró los déficits conductuales cuando se suministraron a ratones adultos con la enfermedad establecida. Los vectores modificados, p.ej. AAVs modificados con péptido se pueden utilizar en terapias para aspectos del SNC de las EDL.

Los autores de la invención han estudiado también la biodistribución *in vivo* de AAV modificado con péptido. Se inyectó por vía intravenosa AAV modificado con péptido ($1,0 \times 10^{11}$ GP) a ratones, AAV-PPS y AAV-TLH a ratones de tipo silvestre, AAV-PFG y AAV-LSS a ratones con MPS VII. Al cabo de 4 semanas, se sacrificó a los ratones y se recogieron el cerebro y el hígado y se extrajo el ADN genómico. Se valoró la biodistribución del virus por PCR en tiempo real. Asimismo, se inyectó AAV-PFG- β Gluc o AAV-WT- β Gluc (10×10^{12} gp/ml) a ratones a través de la vena de la cola. Seis semanas más tarde, se aisló el suero y se llevó a cabo el análisis de la actividad de β -glucuronidasa por ensayo de sustrato fluorescente. Los resultados mostraron que la enzima suministrada al cerebro también alcanzaba la periferia.

Materiales y métodos:

Animales experimentales: Se obtuvieron ratones con MPS VII (B6.C-H-2bm1/byBir-gusmps/+) y controles heterocigotos de Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME), y a continuación, se alimentaron y mantuvieron en las instalaciones para animales de la Universidad de Iowa. Anteriormente se han descrito los ratones con deficiencia de TPP1 (CLN2-I-). Las condiciones de mantenimiento de los animales y los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité para uso y cuidado de animales de la Universidad de Iowa.

Bioselección *in vivo*: Se inyectaron por la vena de la cola de ratones con MPS VII y de tipo silvestre (6-8 semanas de vida) 2×10^{10} ufp de fagos de la biblioteca de presentación de fagos Ph.D.TM-7 (New England Biolabs®, Ipswich, MA) in 200 μ l DMEM (InvitrogenTM, Carlsbad, CA). Tras la incubación durante cinco minutos, se anestesiaron los ratones y se realizó una perfusión transcardial con DMEM. Se extrajo el cerebro y se recuperó el fago de unión y se amplificó. A continuación, se purificó el fago amplificado, se titularon y se reinyectaron en cada una de las cinco rondas consecutivas de selección. Se amplificaron individualmente el fago seleccionado y el fago de control (sin péptido insertado). Se utilizó la biblioteca de presentación de fagos Ph.D.TM-7 original como control no seleccionado. La entrada de fago se mantuvo a 2×10^{10} ufp/ratón en cada ronda. Tras cinco rondas de selección, se secuenció el ADN de 20 clones de fago seleccionados al azar con el cebador -96gIII (New England Biolabs®, Ipswich, MA).

Construcción de cápsidas de AAV2 modificadas con péptido: Se desarrolló el plásmido para clonación de cápsidas modificadas de pXX2, que contenían Rep y Rap de AAV2 tipo silvestre. Se construyó como el plásmido de estructura un plásmido con un fragmento de ADN que codificara aminoácidos AAParadaA y sitios de restricción NotI y AclI insertados entre las posiciones de aminoácido 587 y 588 de Cap de AAV2. Se clonaron los insertos de ADNbc que codificaron péptidos seleccionados en el sitio NotI y AclI como péptido modificado pXX2.

- Producción y titulación de AAV2: Se co-transfectaron placas de células 293T con tres plásmidos: pXX2 o pXX2 modificado con péptido, que suministraron las proteínas Rep y Cap de AAV2; pHelper, que contenía las funciones de auxiliar de adenovirus; y un plásmido de vector que contenía las ITR de AAV2 y el transgén de interés. Se co-transfectaron en veinte placas de 150 mm de diámetro 90 µg de ADN de plásmidos pXX2, pHelper, y vector a una relación molar de 1:1:1. Tras una incubación de 60 horas, se purificó el virus con gradientes de iodixanol y se purificó más con una membrana Mustang Q. Las titulaciones de AAV recombinante fueron determinadas por PCR en tiempo real.
- 5 Ensayo de unión a heparina *in vitro*: Se unieron partículas virales ($1,0 \times 10^{10}$ partículas de genoma) a 50µl de heparin-agarosa en 1ml de solución salina tamponada con fosfato que contenía de MgCl₂ 1 mM y KCl 2,5 mM (PBS-MK) durante 2 horas a 4 °C con mezclado suave. A continuación, se lavó tres veces con 1 ml de PBS-MK y después se eluyó con 30 µl de PBS-MK que contenía NaCl 2M con agitación vigorosa con formación de vórtice. Se analizaron las muestras eluidas por transferencia Western con anticuerpo anti-AAV.
- 10 Biodistribución de virus *in vivo*: Se inyectaron ratones con MPS VII de 6 a 8 semanas de vida y ratones de control de tipo silvestre de edades parejas por vía intravenosa $1,0 \times 10^{11}$ partículas de genoma de AAV2 de tipo silvestre o AAV2 modificado con péptido (PM-AAV) en la vena de la cola (n = 3 ratones por grupo experimental). 4 semanas después de la inyección, se sacrificaron los ratones y se recogieron los tejidos y se congelaron instantáneamente. Se extrajo el ADN genómico de órganos representativos utilizando un equipo de extracción de ADN Qiagen®. Se determinaron copias de AAV en un órgano en concreto por PCR en tiempo real.
- 15 Ensayo de actividad enzimática *in situ*: Se anestesiaron ratones a los que se había inyectado AAV y se perfundieron por vía transcardial con paraformaldehído al 2% enfriado con hielo 4 semanas después de la inyección. Se recogieron los cerebros, se embebieron en compuesto OCT y se seccionaron (16 µm) en un criostato. Se lavaron las secciones en NaOAc 0,05 M, pH 4,5 a 4 °C x 10 min, se incubaron en naftol-SD-BI-β-D-glucuronida 0,25 mM en NaOAc 0,05 M a 37 °C x 40 min, y después se mancharon a 37 °C x 2-4 h con naftol -SD-BI-β-D-glucuronidasa 0,25 mM en tampón de NaOAc 0,05M, pH 5,2 con 1/500 pararosanilina hexazotizada al 2%. Las secciones se tiñeron con tinción de contraste con solución verde de metilo al 0,5%.
- 20 Histología de MPS VII: Se perfundieron por vía transcardiaca ratones con paraformaldehído al 2% y glutaraldehído al 2% en PBS, a continuación, se post-fijaron en el mismo fijador a 4 °C durante toda la noche. Se bloquearon los tejidos, se fijaron en glutaraldehído al 2,5% durante 1 hora a temperatura ambiente y después se post-fijaron en OsO₄ al 1% durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, se deshidrataron las muestras y se embebieron en compuesto Epon™. Se tiñeron secciones de 1 µm de espesor con solución de azul de toluidina y se analizaron para determinar la morfología de la célula utilizando un microscopio de luz digital Olympus BX-51.
- 25 Inmunotinción de TPP1: Se anestesiaron profundamente ratones con ketamina intraperitoneal (100-125 mg/kg) y xilazina (10-12,5 mg/kg), a continuación, se perfundieron por vía transcardiaca con solución salina normal (20 ml) seguido de paraformaldehído al 4% en solución salina normal (20 ml). A continuación, se extrajeron los cerebros y se post-fijaron en paraformaldehído al 4% durante 24 horas a 4°C. Se cortaron secciones de 40 µm de grosor sobre un micrótopo de congelación y se recogieron cuando flotaron libremente en la solución crioconservante (etilenglicol al 30%, sacarosa al 15%, azida sódica al 0,05%, en TBS) para almacenamiento a -20 °C. Las secciones que flotaban libremente se inmunotifieron con anticuerpo primario anti-TPP1 (Abcam) diluido en TBS con BSA al 2%, Na₃ al 0,1%, y Tween 20 al 0,05%. Después de incubar con anticuerpo primario durante toda la noche a 4 °C, se aclararon secciones de tejido con TBS y se incubaron con anticuerpo secundario anti-ratón de cabra biotinilado (Jackson). Las tinciones se desarrollaron con un equipo de sustrato de peroxidasa DAB (Vector Laboratories).
- 30 Condicionamiento al miedo contextual: Se llevaron a cabo los experimentos tal como se ha descrito anteriormente (Liu, G. et al., JNeurosci 25, 9321-7 (2005)). Seis semanas después de la inyección intravenosa con 1×10^{12} partículas de virus de genoma, se sometieron a ensayo los ratones (n = 6 por grupo) en una cámara de acondicionamiento al miedo (Med Association, San Diego, CA). Brevemente, después de 3 min de aclimatación a la cámara de ensayo (contexto 1), cada ratón recibió varias descargas eléctricas en la pata sucesivas (con un lapso de 2 min, 0,75 mA, 50 Hz, 1 seg de duración). La respuesta al miedo fue determinada midiendo la cantidad de conducta de paralización que fue definida como la falta de movimiento aparte de la actividad respiratoria. Se registró la paralización en los primeros 3 min después de la ubicación en la cámara durante el entrenamiento y de nuevo 24 h más tarde en los dos contextos. El contexto 1 fue el utilizado para el entrenamiento. El contexto 2 consistió en una cámara modificada con nuevas señales olfativas, táctiles y visuales. Los animales permanecieron en sus jaulas durante intervalos de 2 h entre ensayo y ensayo en los dos contextos.
- 35 Análisis de sitio de unión de PM-AAV: Se aisló vasculatura de cerebro de ratón centrifugando un homogeneizado de cerebro en bruto en dextrano al 15%, y se purificó por corrimiento a través de mallas de 105 y 70µm. Se utilizó la vasculatura separada por la malla de 70 µm. Se incubaron 50 mg de vasculatura de cerebro en PBS en solitario, PNGasa (100 U/reacción) o condroitinasa ABC (2 U/reacción) a 37 °C x 1 h. Se detuvo la reacción por adición de PBS frío y se lavó 3 veces. A continuación, se incubaron las vasculaturas tratadas en virus ($1,0 \times 10^{11}$) en 500 µl de PBS con BSA al 0,1 % a 4 °C x 1 h. Después del lavado, se aisló el ADN y se analizaron las partículas genómicas virales por PCR en tiempo real. Para la unión competitiva de AAV-PFG a la vasculatura del cerebro de ratones con
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

MPS VII, se incubaron 50 mg de vasculaturas del cerebro con AAV-PFG ($1,0 \times 10^{11}$) en presencia o ausencia de 2 mg/ml de condroitín sulfato a $4^\circ\text{C} \times 1 \text{ h}$.

5 Análisis estadístico: Todos los datos se expresan como medias \pm desviación típica. Se aplicó una prueba t de Student no pareada para examinar las diferencias estadísticas. Los datos se consideraron significativos cuando $p < 0,05$.

10 Debe interpretarse que el uso de los términos “un” y “una” y “el” y “la”, así como determinantes similares en el contexto de la descripción de la invención deben cubrir tanto el singular como el plural a no ser que se indique de otro modo en el presente documento o entre en contradicción con el contexto. Debe interpretarse que los términos “comprende” “tiene”, “incluye” y “contiene” son términos abiertos (es decir significan “incluyen, pero sin limitarse a”) a no ser que se señale de otro modo. Se pretende que la cita de los intervalos de valores en el presente documento sirva meramente como método abreviado para referirse individualmente a cada valor por separado que entra dentro del intervalo, a no ser que se indique de otro modo en el presente documento, y se incorpora cada valor por separado en la memoria descriptiva como si se hubiera citado específicamente en el presente documento. Todos los métodos descritos en el presente documento se pueden realizar en cualquier orden que sea adecuado a no ser que se indique de otro modo en el presente documento o entre en clara contradicción con el contexto. El uso de cualquier ejemplo y de todos los ejemplos, o las expresiones del lenguaje que se usen para referirse a ejemplos (p.ej. “tal como”) que se proporcionan en el presente documento han de interpretarse simplemente como términos para ilustrar mejor la invención y no entrañan limitación del alcance de la invención a no ser que se reivindique de otro modo. Ninguna expresión semántica de la memoria descriptiva deberá interpretarse como indicadora de un elemento no reivindicado como esencial para la práctica de la invención.

15

20

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de la cápside de virus adenoasociado (AAV) modificada, que comprende un péptido de direccionamiento, en la que el péptido de direccionamiento tiene una longitud de 3 a 10 aminoácidos; y en la que:
- 5 (i) la cápside de AAV modificada que comprende el péptido de direccionamiento dirige un AAV al endotelio vascular del cerebro de tipo silvestre, y el péptido de direccionamiento es TLH (SEQ ID NO: 3), o QSXY (SEQ ID NO: 4), PYFPLS (SEQ ID NO: 5), YAPLTPS (SEQ ID NO: 6), PLSPSAY (SEQ ID NO: 7), DSPAHPS (SEQ ID NO: 8), GTPTHPS (SEQ ID NO: 9), PDAPSNH (SEQ ID NO: 10), TEPHWPS (SEQ ID NO: 11), SPPLPPK (SEQ ID NO: 12), SPKPPPG (SEQ ID NO: 13), NWSPWDP (SEQ ID NO: 14), DSPAHPS (SEQ ID NO: 15), GWTLHMK (SEQ ID NO: 16), KIPPTLH (SEQ ID NO: 17), ISQTLHG (SEQ ID NO: 18), QSFYILT (SEQ ID NO: 19), o TTQSEYG (SEQ ID NO:20), tal como se expresa en una orientación amino a carboxi o en una orientación carboxi a amino; o
- 10 (ii) la cápside de AAV modificada que comprende el péptido de direccionamiento dirige un AAV al endotelio vascular del cerebro enfermo, siendo el péptido de direccionamiento LXSS (SEQ ID NO: 21), o SIXA (SEQ ID NO: 23), MLVSSPA (SEQ ID NO: 24), LPSSLQK (SEQ ID NO: 25), PPLLKSS (SEQ ID NO: 26), PXKLDSS (SEQ ID NO: 27), AWTLASS (SEQ ID NO: 28), WPFYGTP (SEQ ID NO: 29), GTFPFLG (SEQ ID NO: 30), GQVPFMG (SEQ ID NO: 31), ANFSILA (SEQ ID NO: 32), GSIWAPA (SEQ ID NO: 33), SIAASFS (SEQ ID NO: 34), o GMNAFRA (SEQ ID NO: 41), tal como se expresa en una orientación amino a carboxi o en una orientación carboxi a amino.
- 15 2. La proteína de la cápside de la reivindicación 1, en la que el péptido de direccionamiento tiene 3, 4, 5, 6 o 7 aminoácidos de longitud y/o el AAV es AAV2.
- 25 3. Una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la cápside modificada tal como se ha descrito en la reivindicación 1 o 2.
4. Un virus AAV que contiene la proteína de la cápside de la reivindicación 1 o 2.
- 30 5. Un vector viral que comprende un ácido nucleico que codifica la proteína de la cápside de la reivindicación 1 o 2.
6. El vector viral de la reivindicación 5, comprendiendo además el vector viral una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un ácido nucleico de interés; preferentemente, en el que el ácido nucleico de interés es un agente terapéutico, preferentemente, en el que el agente terapéutico es una enzima o una molécula de iARN, preferentemente, en el que la enzima es β -glucuronidasa o tripeptidil proteasa.
- 35 7. Una célula que comprende el vector viral de la reivindicación 5 o que está transducida por un virus AAV de la reivindicación 4; siendo preferentemente la célula, una célula de mamífero, siendo la célula, una célula humana *in vitro*, o siendo la célula, una célula no humana *in vitro* o *in vivo*, preferentemente, siendo la célula, una célula endotelial, preferentemente, siendo la célula una célula endotelial vascular.
- 40 8. El vector viral de la reivindicación 5, para uso en el suministro de un agente al sistema nervioso central de un sujeto no humano, comprendiendo el uso la transducción de células endoteliales vasculares con el vector viral de modo que las células endoteliales vasculares transducidas expresan el agente y suministran el agente al sistema nervioso central del sujeto.
- 45 9. Un vector viral como se describe en la reivindicación 5, para su uso en el tratamiento o el diagnóstico médico.
10. El uso del vector viral de la reivindicación 5, o de la célula de la reivindicación 7, para preparar un medicamento útil para el tratamiento de una enfermedad por depósito lisosomal en un mamífero.
- 50 11. Una célula tal como se describe en la reivindicación 7, para su uso en el tratamiento o el diagnóstico médico.
12. La proteína de la cápside de la reivindicación 2, en la que el AAV es AAV2 y en la que el péptido de direccionamiento se inserta entre las posiciones de aminoácido 587 y 588 del AAV2 V3.
- 55 13. El vector viral de la reivindicación 6, en el que el agente terapéutico es una enzima.
14. El vector viral de la reivindicación 13, en el que la enzima es la β -glucuronidasa o la tripeptidil proteasa.
- 60 15. El vector viral de la reivindicación 6, en el que el agente terapéutico es una molécula de iARN.

Figs 1A y 1B



Figura 1A

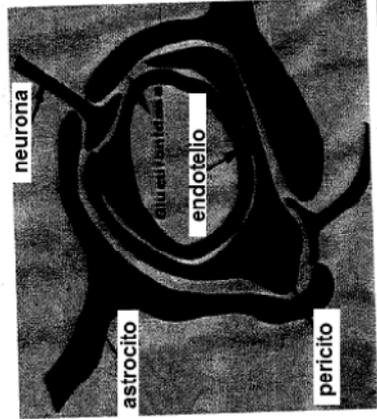


Figura 1B

Fig.2A

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
<p>PXXPS (8) SEQ ID NO:1</p> <p>PYFPSLS (2) SEQ ID NO:5</p> <p>YAPLTPS SEQ ID NO:6</p> <p>PLSPSAY SEQ ID NO:7</p> <p><u>DSPAHP</u>S SEQ ID NO:8</p> <p>GTPHPS SEQ ID NO:9</p> <p>PDAPSNH SEQ ID NO:10</p> <p>TEPHWPS SEQ ID NO:11</p>	<p>SPPLPPK SEQ ID NO:12</p> <p>SPKPPPG SEQ ID NO:13</p> <p>NWSPWDP SEQ ID NO:14</p> <p><u>DSPAHP</u>S SEQ ID NO:15</p>	<p><u>GWTLHNK</u>(3) SEQ ID NO:16</p> <p>KIPPTLH SEQ ID NO:17</p> <p>ISQTLHG SEQ ID NO:18</p>	<p>QSXY (2) SEQ ID NO:4</p> <p>QSFYILT SEQ ID NO:19</p> <p>TTQSEYG SEQ ID NO:20</p>

Fig.2B

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
<p>LxSS (7) SEQ ID NO:21</p> <p>MLVSSPA SEQ ID NO:24</p> <p>LPSSLQK (2) SEQ ID NO:25</p> <p>PPLLKSS (2) SEQ ID NO:26</p> <p>PXKLDSS SEQ ID NO:27</p> <p>AWTLASS SEQ ID NO:28</p>	<p>PFXG (5) SEQ ID NO:22</p> <p>WPFYGTP(3) SEQ ID NO:29</p> <p>GTFPFLG SEQ ID NO:30</p> <p>GQVPFMG SEQ ID NO:31</p>	<p>SIXA (3) SEQ ID NO:23</p> <p>ANFSILA SEQ ID NO:32</p> <p>GSIWAPA SEQ ID NO:33</p> <p>SIAASFS SEQ ID NO:34</p>

Fig. 2C

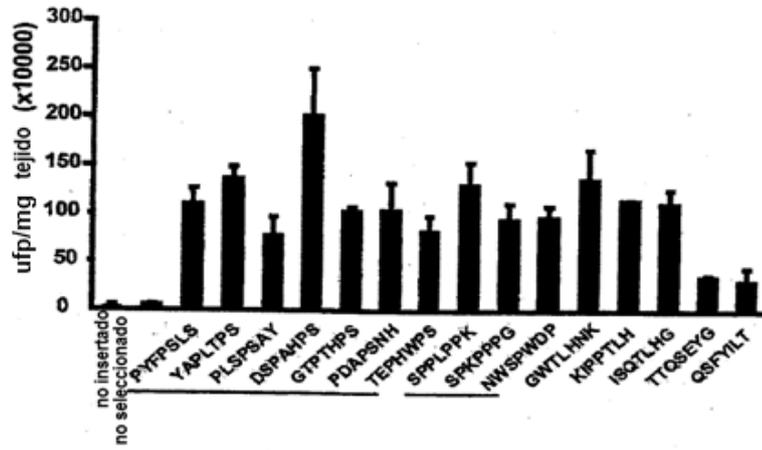


Fig. 2D

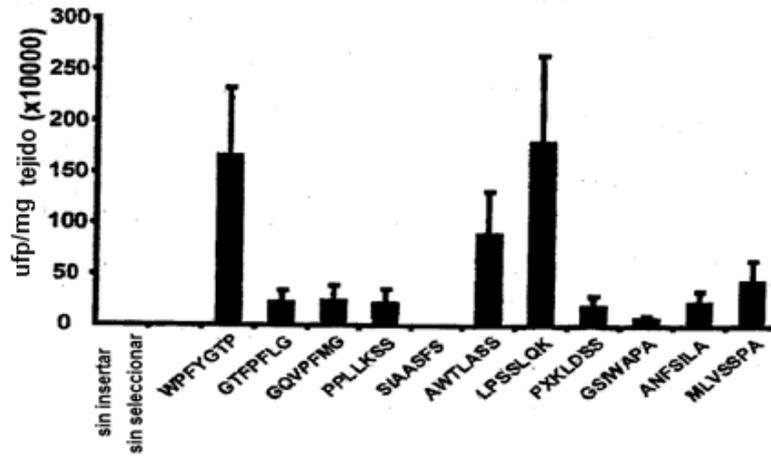


Fig. 3A

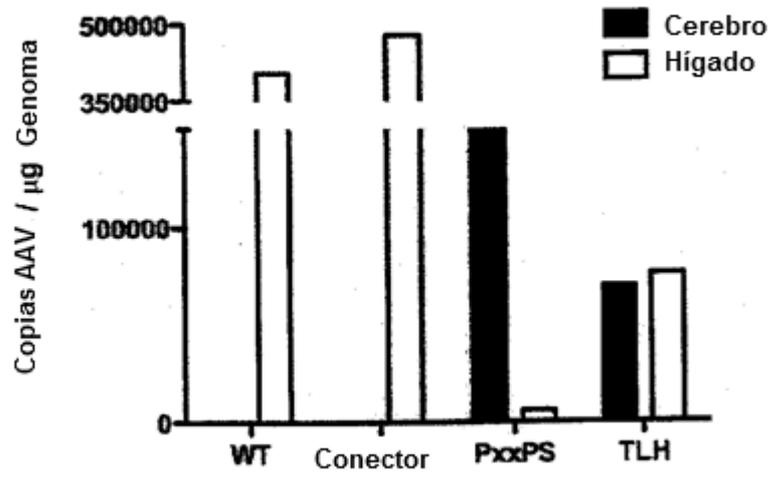


Fig. 3B

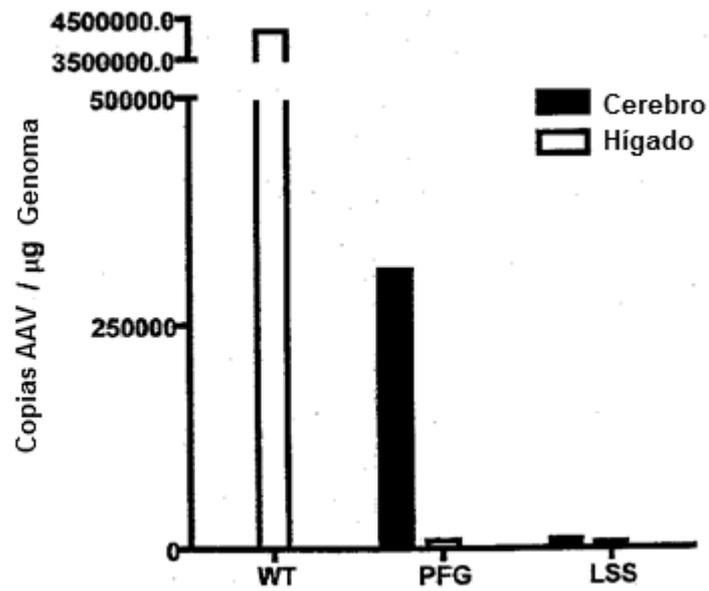


Fig. 4

Fig. 4A-4H

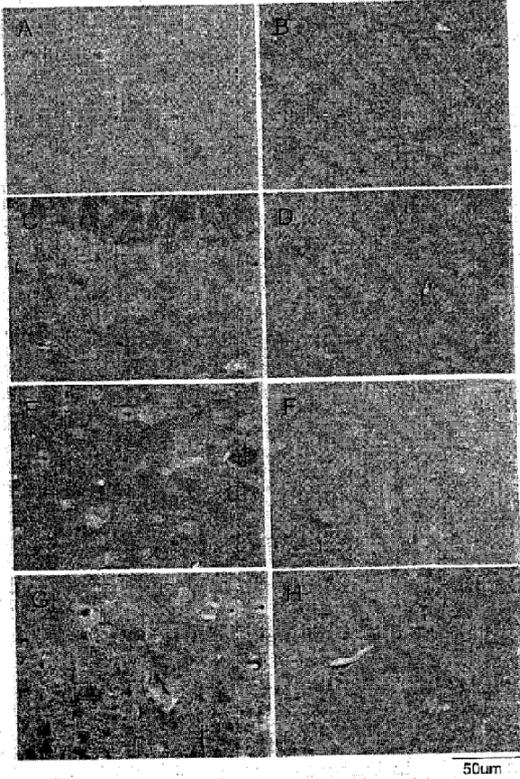


Fig. 4I

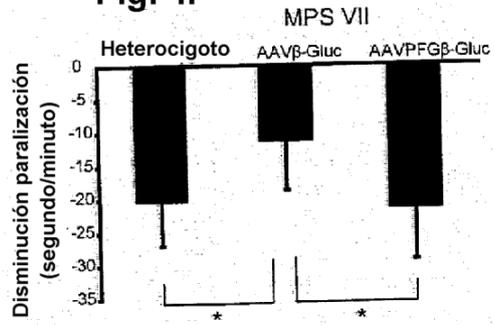


Fig. 4J

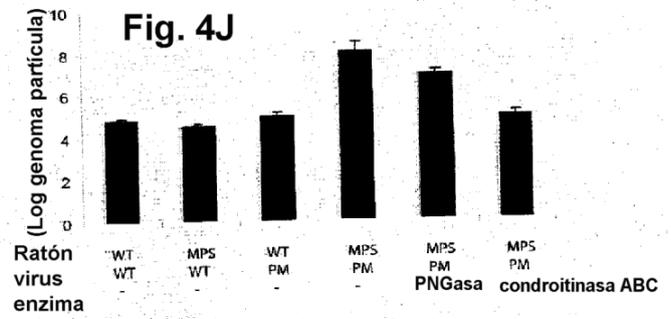
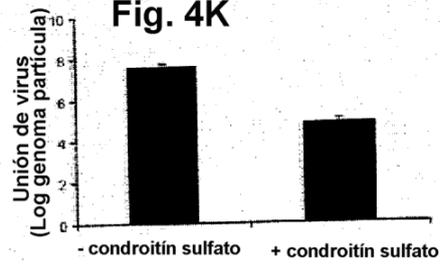


Fig. 4K



Figuras 5A-5E

a	Péptido	Titulación viral
<i>CLN2</i> ^{-/-} Ratón	ARFANMG	1,76 x 10¹²

