

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 628 889**

51 Int. Cl.:

C12N 15/864 (2006.01)

C12N 15/33 (2006.01)

A61K 31/517 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 7/04 (2006.01)

A61P 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.02.2011 PCT/US2011/023715**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.08.2011 WO11097456**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.02.2011 E 11740407 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.04.2017 EP 2531604**

54 Título: **Composiciones y métodos para la transducción mejorada del parvovirus**

30 Prioridad:

05.02.2010 US 301998 P

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

04.08.2017

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT
CHAPEL HILL (100.0%)
308 Bynum Hall, Campus Box 4105
Chapel Hill, NC 27599-4105, US**

72 Inventor/es:

**MONAHAN, PAUL E. y
SAMULSKI, RICHARD JUDE**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 628 889 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

Composiciones y métodos para la transducción mejorada del parvovirus

5 Antecedentes de la invención

10 Se conoce que los parvovirus, tales como los virus adenoasociados (AAV), desfavorecen los genomas que difieren sustancialmente en tamaño del genoma silvestre (por ejemplo, menos de aproximadamente 80 a 85% y mayor que aproximadamente 105 a 107 % del tamaño silvestre). Esta observación es válida además, para vectores de parvovirus recombinantes, donde puede limitarse el tamaño del transgén y/o secuencias reguladoras (tales como promotores) que pueden empaquetarse y suministrarse eficazmente a las células objetivo por el vector.

15 La técnica anterior incluye Mol. Therapy, 17, 2009, S313, Resumen 818 que describe que los constructos del Factor VIII AAV2 y Factor VIII AAV8 entregados in vivo con un inhibidor del proteasoma conducen a una mayor persistencia de la expresión de transgenes mediada por AAV.

20 La presente invención supera deficiencias anteriores en la técnica proporcionando vectores de virus adenoasociados (AAV) que contienen un genoma de AAV sobredimensionado que comprende una secuencia de nucleótidos heteróloga, y métodos para su uso.

Resumen de la invención

25 La invención a la que pertenece la presente especificación se expone en las reivindicaciones adjuntas a esta descripción.

30 En un aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende: (a) un vector de virus adenoasociado (AAV) que comprende un ácido nucleico heterólogo de interés en donde el genoma del vector de AAV está sobredimensionado con respecto a un genoma de AAV silvestre; y (b) un inhibidor del proteasoma. En algunas modalidades, el tamaño del genoma del vector de AAV puede ser mayor que aproximadamente 5,2 kb y en modalidades adicionales, el vector de AAV puede comprender el genoma de vector monocatenario de AAV, el genoma de vector bicatenario de AAV o el genoma de vector autocomplementario de AAV.

En la invención, el inhibidor del proteasoma es bortezomib (Velcade®).

35 En diversas modalidades de esta descripción, el ácido nucleico heterólogo de interés puede codificar un factor de la coagulación, que puede ser el Factor VIII (FVIII). En algunas modalidades, el ácido nucleico heterólogo de interés puede codificar la distrofina.

40 En algunas modalidades de esta invención, el ácido nucleico heterólogo puede comprender una secuencia codificante que se ha optimizado en relación con una secuencia de nucleótidos silvestre. En otras modalidades, el ácido nucleico heterólogo puede comprender secuencias no codificantes que se han optimizado con respecto a secuencias no codificantes silvestres. En aún otras modalidades, el genoma del vector de AAV puede optimizarse con relación a un genoma de AAV silvestre.

45 Otros aspectos de esta invención incluyen una formulación farmacéutica que comprende una composición de esta invención en un portador farmacéuticamente aceptable.

50 La presente invención proporciona además métodos in vitro, incluyendo un método in vitro para suministrar un ácido nucleico de interés a una célula, que comprende introducir la composición o la formulación farmacéutica de esta invención en la célula.

55 Se proporciona además en la presente descripción, un método para suministrar un ácido nucleico de interés a un sujeto (por ejemplo, un sujeto que lo necesita), que comprende administrar la composición o la formulación farmacéutica de esta invención al sujeto.

60 Aspectos adicionales de esta descripción incluyen un método para suministrar un ácido nucleico de interés a una célula, que comprende poner en contacto a la célula con:(a) un vector de virus adenoasociado (AAV) que comprende un ácido nucleico heterólogo de interés en donde el genoma del vector de AAV está sobredimensionado en comparación con un genoma de AAV silvestre; y (b) un inhibidor del proteasoma.

65 Se proporciona además en la presente descripción, un método para suministrar un ácido nucleico de interés a un sujeto (por ejemplo, un sujeto que lo necesita), que comprende administrar al sujeto:(a) un vector de virus adenoasociado (AAV) que comprende un ácido nucleico heterólogo de interés en donde el genoma del vector de AAV está sobredimensionado en comparación con un genoma de AAV silvestre; y (b) un inhibidor del proteasoma.

En los métodos que involucran una célula, la célula puede ser una célula muscular y/o una célula hepática y/o una célula en un sitio articular o osteocondral.

5 Además, en los métodos, el vector de AAV puede administrarse antes, después y/o simultáneamente con la administración del inhibidor del proteasoma, en cualquier combinación.

En la invención, el inhibidor del proteasoma es bortezomib (Velcade®). El ácido nucleico heterólogo de interés puede codificar el FVIII. En otras modalidades, el ácido nucleico heterólogo de interés puede codificar la distrofina.

10 Adicionalmente, en la invención, el ácido nucleico o secuencia nucleotídica heteróloga puede comprender una secuencia codificante que se ha optimizado en relación con una secuencia de nucleótidos silvestre. En otras modalidades, el ácido nucleico o secuencia nucleotídica heteróloga puede comprender secuencias no codificantes que se han optimizado con respecto a secuencias no codificantes silvestres. En aún otras modalidades, el genoma del vector de AAV puede optimizarse con relación a un genoma de AAV silvestre.

15 Todavía aspectos adicionales de esta descripción incluyen un kit que comprende:(a) un vector de virus adenoasociado (AAV) que comprende un ácido nucleico heterólogo de interés en donde el genoma del vector de AAV está sobredimensionado en comparación con un genoma de AAV silvestre; y (b) un inhibidor del proteasoma. El kit puede comprender un ácido nucleico heterólogo de interés que codifica el FVIII. Un kit también puede comprender además un ácido nucleico heterólogo de interés que codifica la distrofina.

20 En el kit de esta invención, el inhibidor del proteasoma es bortezomib (Velcade®).

25 La presente descripción proporciona además un método para tratar la hemofilia A en un sujeto (*por ejemplo*, un sujeto humano), que comprende administrar al sujeto:(a) un vector de AAV que comprende una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica el FVIII; y (b) bortezomib (Velcade®).

30 Como se indica anteriormente, en tales métodos de tratamiento, el ácido nucleico o secuencia nucleotídica heteróloga que codifica el FVIII puede comprender una secuencia codificante que se ha optimizado en relación con una secuencia de nucleótidos silvestre. En otras modalidades, el ácido nucleico o secuencia nucleotídica heteróloga que codifica FVIII puede comprender las secuencias no codificantes que se han optimizado en relación a las secuencias no codificantes silvestres. En aún otras modalidades, el genoma del vector de AAV puede optimizarse con relación a un genoma de AAV silvestre.

35 En los métodos para tratar la hemofilia A, el vector de AAV puede administrarse antes, después y/o simultáneamente con la administración de bortezomib (Velcade®), en cualquier combinación. En modalidades particulares, el vector de AAV se administra antes de la administración del bortezomib (Velcade®).

40 En la presente descripción se proporciona también un método para tratar la hemofilia A en un sujeto (*por ejemplo*, un sujeto humano), que comprende administrar al sujeto:(a) un vector de AAV que comprende una secuencia nucleotídica heteróloga que codifica la distrofina; y (b) bortezomib (Velcade®).

45 Además, en los métodos de tratamiento, el ácido nucleico o la secuencia nucleotídica heteróloga que codifica la distrofina puede comprender una secuencia codificante que se ha optimizado con respecto a una secuencia de nucleótidos silvestre. En otras modalidades, el ácido nucleico o secuencia nucleotídica heteróloga que codifica la distrofina puede comprender las secuencias no codificantes que se han optimizado en relación a las secuencias no codificantes silvestres. En aún otras modalidades, el genoma del vector de AAV puede optimizarse con relación a un genoma de AAV silvestre.

50 En los métodos para tratar la atrofia muscular, el vector de AAV puede administrarse antes, después y/o simultáneamente con la administración de bortezomib (Velcade®), en cualquier combinación. En modalidades particulares, el vector de AAV se administra antes de la administración del bortezomib (Velcade®).

55 En modalidades particulares de las composiciones y métodos de esta invención, el vector de AAV es el AAV tipo 8. En algunas modalidades de esta invención, el vector de AAV es el AAV tipo 2. En algunas modalidades de esta invención, el vector de AAV es el AAV tipo 5.

60 Las modalidades particulares de esta invención se dirigen a vectores de parvovirus para el suministro de los ácidos nucleicos a las células, tanto *in vitro* como *in vivo*, en combinación o asociación temporal con la administración de Velcade®. En cuanto a la descripción, se refiere a compuestos alternativos con mecanismos de acción similares. Las modalidades adicionales se dirigen al suministro de nuevos factores de coagulación sanguínea modificados *por ejemplo*, el suministro de AAV que codifica el codón optimizado del factor VIII de la coagulación (*por ejemplo*, como se describe en el documento de patente núm. PCT/US2007/071 553) en combinación o asociación temporal con Velcade®.

65 Breve descripción de los dibujos

Figura 1. El inhibidor del proteasoma aumenta la expresión de los vectores de AAV-2 *in vitro*. Análisis de clasificación celular activada por fluorescencia de la expresión de la proteína fluorescente verde (GFP) en las células 293T transducidas con el AAV2 monocatenario convencional (paneles izquierdos) y con los vectores de AAV2 autocomplementarios (panel derecho) en presencia o ausencia del inhibidor del proteasoma, bortezomib. Se indica la intensidad media de fluorescencia (IMF) y el porcentaje de células positivas para GFP. Las células 293T no transducidas sirvieron como control negativo.

Figuras 2A-D. Efecto de la coadministración del inhibidor del proteasoma con vectores de AAV2 y AAV8 para la corrección de ratones deficientes de factor IX y deficientes de factor VIII. Los ratones hemofílicos recibieron 3×10^{10} genomas de vector/ratón de vectores de AAV2 o AAV8 individuales con o sin inhibidor del proteasoma (0,5 mg/kg de peso corporal) coadministrados en la vena porta. (A) y (B) Porcentaje de actividad de factor IX humano normal en ratones FIX^{-/-} seguido de AAV2 (a) o AAV8 (b) con o sin bortezomib. (C) y (D) Porcentaje de actividad del factor VIII canino normal (ensayo de actividad cromogénica) en ratones FVIII^{-/-} seguido de AAV2 (c) o AAV8 (d) en ausencia de inhibidores del proteasoma MG-132 y bortezomib. Los datos se presentan como la media \pm DE. * Bortezomib frente control de AAV-cFVIII, $P < 0,05$; ** Bortezomib frente MG-132 y control de AAV-cFVIII, $P < 0,05$.

Figura 3. Localización hepatoesplénica de AAV. Expresión de la luciferasa mediante la dexametasona coadministrada. Se inyectaron ratones C57B6 a través de la vena de la cola con 10^{11} genoma/ratón de AAV8a luciferasa con o sin coadministración por vía intravenosa de 0,2 mg de dexametasona. Una semana más tarde se obtuvo imágenes de bioluminiscencia vital del cuerpo entero y la intensidad de la señal se expresa como flujo total de fotones (fotones /s/cm²).

Figura 4. Efecto persistente de la dosis única de bortezomib en la expresión de cFVIII mediada por AAV2 y AAV8 en ratones con hemofilia A. Ratones FVIII^{-/-} se inyectaron con AAV2 o AAV8 que expresaban cFVIII a una dosis de 3×10^{10} gc/ratón, sin PI o con bortezomib (0,5 mg/kg de peso corporal) o bortezomib más dexametasona (0,2 mg/animal, equivalente a 8 mg/kg de peso corporal) mediante inyección de la vena porta. El plasma citratado se recogió en puntos de tiempo definidos para la actividad de FVIII detectada mediante el ensayo de actividad cromogénica. Los datos se presentan como media \pm DE en % de actividad de la actividad canina normal. * AAV8. CFVIII + Bortezomib (con o sin dexametasona) frente al vector de AAV8. CFVIII sólo, $P < 0,05$. # AAV2. CFVIII + Bortezomib frente a vector de AAV2. CFVIII sólo, $P < 0,05$.

Figura 5. Efecto persistente de la terapia con inhibidores del proteasoma sobre la corrección de la coagulación mediante la terapia génica de cFVIII mediada por AAV8 dirigida a hígado en perros con hemofilia A. Parte superior: Tiempo de Coagulación de la Sangre Total (WBCT) en 2 perros machos y 1 hembra con hemofilia A tratados sólo con el vector y sin bortezomib. Inferior: El WBCT en 2 perros machos y 2 hembras con hemofilia A tratados con la coadministración de una dosis única de bortezomib intravenoso (I.V.) en el momento de la administración del vector de AAV. El intervalo normal de 6-10 minutos para los perros hemostáticamente normales se indica mediante la región sombreada. Los perros hemofílicos tuvieron valores iniciales de WBCT que se prolongaron por más de 20 minutos.

Figura 6. La expresión a partir del vector de AAC del factor VIII que tiene un ADNc de FVIII de codón optimizado se aumenta adicionalmente mediante la coadministración del inhibidor del proteasoma bortezomib (PI) en el suministro del vector.

Figura 7. La coadministración en el espacio intraarticular del inhibidor del proteasoma con el AAV resulta en una mayor acción terapéutica del factor VIII expresado para prevenir el daño inducido por el sangrado en las articulaciones. NSIA: inyección intraarticular de salina normal.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se describirá ahora con más detalle con referencia a las figuras adjuntas, en las que se muestran las modalidades preferidas de la invención. Esta invención puede, sin embargo, realizarse en formas diferentes y no debe interpretarse como limitada a las modalidades expuestas en la presente. Más bien, estas modalidades se proporcionan para que esta descripción sea exhaustiva y completa, y refleje completamente el alcance de la invención a los expertos en la técnica.

A menos que se especifique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado que el conocido comúnmente por el experto en la técnica a la que pertenece esta invención. La terminología que se usa en la descripción de la invención en la presente es con el propósito de describir modalidades particulares y no se pretende que sean limitativas de la invención.

Las secuencias de nucleótidos se presentan en la presente descripción solo monocatenaria, en la dirección 5' a 3', de izquierda a derecha, a menos que se indique específicamente lo contrario. Los nucleótidos y aminoácidos se representan en la presente descripción de la manera recomendada por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica de

IUPAC-IUB, o (para aminoácidos), ya sea por el código de una letra o el código de tres letras, ambos de acuerdo con 37 CFR §1.822 y uso establecido.

5 Excepto que se indique lo contrario, los métodos estándar conocidos por los expertos en la técnica pueden usarse para el clonaje de genes, amplificación y detección de ácidos nucleicos y similares. Tales técnicas se conocen por los expertos en la técnica. *Ver, por ejemplo* Sambrook y otros, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2da edición (Cold Spring Harbor, NY, 1989); Ausubel y otros *Current Protocols in Molecular Biology* (Green Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., Nueva York).

10 Definiciones

Como se usa en la presente descripción, "uno," "una" y "el/la" pueden significar uno o más de uno, en dependencia del contexto en que se usa. Por ejemplo, "una" célula puede significar una célula o múltiples células.

15 Además, como se usa en la presente descripción, "y/o" se refiere y abarca a todas y cada una de las combinaciones posibles de uno o más de los elementos enumerados asociados, así como la falta de combinaciones cuando se interpreta en la alternativa ("o").

20 Además, el término "aproximadamente", como se usa en la presente descripción cuando se refiere a un valor medible tal como una cantidad de un compuesto o agente de esta invención, dosis, tiempo, temperatura y similares, se entiende que abarca variaciones de $\pm 20\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, $\pm 1\%$, $\pm 0,5\%$, o incluso $\pm 0,1\%$ de la cantidad especificada.

25 El término "consiste esencialmente en" (y variantes gramaticales), como se aplica a una secuencia polinucleotídica o polipéptida de esta invención, significa un polinucleótido o polipéptido que consiste tanto de la secuencia citada (*por ejemplo*, sec. con núm. de ident.) como de un total de nucleótidos o aminoácidos adicionales o frecuentemente menos (*por ejemplo*, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10) en el extremo 5' y/o 3' o extremos N-terminal y/o C-terminal de la secuencia recitada tal que la función del polinucleótido o polipéptido no se altera materialmente. El total de diez o menos nucleótidos o aminoácidos adicionales incluye el número total de nucleótidos o aminoácidos adicionales añadidos juntos en ambos extremos. El término "materialmente alterado", tal como se aplica a los polinucleótidos de la invención, se refiere a un aumento o disminución en la capacidad para expresar el polipéptido codificado de al menos aproximadamente 50% o más en comparación con el nivel de expresión de un polinucleótido que consiste en la secuencia enumerada. El término "materialmente alterado", tal como se aplica a los polipéptidos de la invención, se refiere a un aumento o disminución en la actividad de al menos aproximadamente 50% o más en comparación con la actividad de un polipéptido que consiste en la secuencia enumerada.

35 El término "parvovirus" como se usa en la presente descripción abarca la familia *Parvoviridae*, incluyendo parvovirus y dependovirus de replicación autónoma. Los parvovirus autónomos incluyen miembros de los géneros *Parvovirus*, *Erythrovirus*, *Densovirus*, *Iteravirus*, y *Contravirus*. Los parvovirus autónomos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a los virus minutos de ratón, parvovirus bovino, parvovirus canino, parvovirus de pollo, virus de la panleucopenia felino, parvovirus felino, parvovirus de ganso, parvovirus H1, parvovirus de pato almizclado, virus B19 y cualquier otro parvovirus autónomo descubierto posteriormente o conocido en la actualidad. Se conocen por los expertos en la técnica otros parvovirus autónomos. *Ver, por ejemplo*, BERNARD N. FIELDS y otros, *VIROLOGY*, volumen 2, capítulo 69 (4ta edición, Lippincott-Raven Publishers).

40 Como se usa en la presente descripción, el término "virus adenoasociado" (AAV) incluye, pero no se limita al AAV tipo 1, AAV tipo 2, AAV tipo 3 (incluidos los tipos 3A y 3B), AAV tipo 4, AAV tipo 5, AAV tipo 6, AAV tipo 7, AAV tipo 8, AAV tipo 9, AAV tipo 10, AAV tipo 11, AAV aviar, AAV bovino, AAV canino, AAV equino, AAV ovino y cualquier otro AAV descubierto posteriormente o conocido en la actualidad. *Ver, por ejemplo*, BERNARD N. FIELDS y otros, *VIROLOGY*, volumen 2, capítulo 69 (4ta edición, Lippincott-Raven Publishers). Recientemente, se han identificado una serie de nuevos serotipos y clados potenciales de VAA (*ver, por ejemplo*, Gao y otros, (2004) *J. Virology* 78:6381-6388; Moris y otros, (2004) *Virology* 33:375-383; y Tabla 5).

55 Las secuencias genómicas de los diversos serotipos de AAV y los parvovirus autónomos, así como las secuencias de las repeticiones terminales (TRs), las proteínas Rep y las subunidades de la cápsida son conocidas en la técnica. Tales secuencias pueden encontrarse en la literatura o en bases de datos públicas tales como GenBank. *Ver, por ejemplo*, los números de acceso al GenBank NC_002077, NC_001401, NC_001729, NC_001863, NC_001829, NC_001862, NC_000883, NC_001701, NC_001510, NC_006152, NC_006261, AF063497, U89790, AF043303, AF028705, AF028704, J02275, J01901, J02275, X01457, AF288061, AH009962, AY028226, AY028223, NC_001358, NC_001540, AF513851, AF513852, AY530579; cuyas descripciones se incorporan como referencia en la presente descripción para enseñar las secuencias de aminoácidos y ácido nucleicos de parvovirus y AAV. *Ver además, por ejemplo*, Srivistava y otros, (1983) *J. Virology* 45:555; Chiorini y otros, (1998) *J. Virology* 71:6823; Chiorini y otros, (1999) *J. Virology* 73:1309; Bantel-Schaal y otros, (1999) *J. Virology* 73:939; Xiao y otros, (1999) *J. Virology* 73:3994; Muramatsu y otros, (1996) *Virology* 221:208; Shade y otros, (1986) *J. Virol.* 58:921; Gao y otros, (2002) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 99:11854; Moris y otros, (2004) *Virology* 33:375-383; publicaciones de patentes internacionales núm. WO 00/28061, WO 99/61601, WO 98/11244; y documento de patente de los Estados Unidos núm. 6.156.303.

El término "tropismo" tal como se usa en la presente descripción se refiere preferencialmente a la entrada del virus en ciertas células o tejidos, seguido opcionalmente por la expresión (*por ejemplo*, transcripción y, opcionalmente, traducción) de una secuencia o secuencias que se transportaron por el genoma viral en la célula, *por ejemplo*, para un virus recombinante, la expresión de las secuencias nucleotídicas heterólogas. Los expertos en la técnica apreciarán que la transcripción de una secuencia de ácido nucleico heteróloga del genoma viral puede no iniciarse en ausencia de factores de acción trans, *por ejemplo*, para un promotor inducible o una secuencia de ácido nucleico regulada de cualquier otra manera. En el caso de un genoma de rAAV, la expresión génica a partir del genoma viral puede ser de un provirus establemente integrado, de un episoma no integrado, así como de cualquier otra forma en la que el virus pueda entrar en la célula.

Como se usa en la presente descripción, el término "polipéptido" abarca los péptidos y proteínas, a menos que se indique lo contrario.

Un "polinucleótido" es una secuencia de bases nucleotídicas, y puede ser ARN, ADN o secuencias híbridas de ADN-ARN (incluyendo tanto nucleótidos de origen natural como no natural), pero en modalidades representativas son secuencias de ADN o bien monocatenarias o bicatenarias.

Como se usa en la presente descripción, un polinucleótido "aislado" (por ejemplo, un "ADN aislado" o un "ARN aislado") significa un polinucleótido al menos parcialmente separado de al menos algunos de los otros componentes del organismo o virus de origen natural, por ejemplo, los componentes estructurales celulares o víricos u otros polipéptidos o ácidos nucleicos comúnmente encontrados que se asocian con el polinucleótido.

Igualmente, un polipéptido "aislado" significa un polipéptido que está al menos parcialmente separado de al menos algunos de los otros componentes del organismo o virus de origen natural, por ejemplo, los componentes estructurales celulares o víricos u otros polipéptidos o ácidos nucleicos comúnmente encontrados que se asocian con el polipéptido.

Como se usa en la presente descripción, por "aislar" o "purificar" (o equivalentes gramaticales) un vector viral, significa que el vector viral está al menos parcialmente separado de al menos algunos de los otros componentes en el material de partida.

Un "polipéptido terapéutico" es un polipéptido que puede aliviar o reducir los síntomas que resultan de una ausencia o defecto en una proteína en una célula o sujeto. Alternativamente, un "polipéptido terapéutico" es uno que de cualquier otra forma confiere un beneficio a un sujeto, *por ejemplo*, efectos contra el cáncer o mejoría en la supervivencia del trasplante.

Por los términos "tratar", "que se trata" o "tratamiento" (o términos gramaticalmente equivalentes) se entiende que la gravedad de la afección del sujeto está reducida o al menos parcialmente mejorada o superada y/o que se consigue algún alivio, mitigación o disminución en al menos un síntoma clínico y/o existe un retraso en la progresión de la enfermedad y/o prevención o retraso en el inicio de una enfermedad o trastorno. Por lo tanto, los términos "tratar", "que se trata" o "tratamiento" (o términos gramaticalmente equivalentes) se refieren tanto a regímenes profilácticos como terapéuticos.

Una "respuesta inmune activa" o "inmunidad activa" se caracteriza por "la participación de tejidos y células huésped después de un encuentro con el inmunógeno. Implica la diferenciación y proliferación de células inmunocompetentes en tejidos linforreticulares, que conducen a la síntesis de anticuerpos o al desarrollo de la reactividad mediada por células, o ambas." Herbert B. Herscovitz, *Immunophysiology: Cell Function and Cellular Interactions in Antibody Formation*, en IMMUNOLOGY: BASIC PROCESSES 117 (Joseph A. Bellanti edición, 1985). Como alternativa se indicó, una respuesta inmune activa que se expresa por el huésped después de la exposición a inmunógenos por infección o por vacunación. La inmunidad activa puede contrastarse con la inmunidad pasiva, que se adquiere a través de la "transferencia de las sustancias preformadas (anticuerpo, factor de transferencia, injerto tímico, interleucina-2) de un huésped inmunizado de forma activa a un huésped no inmune." *Id.*

Una respuesta inmunitaria "protectora" o inmunidad "protectora" como se usa en la presente descripción indica que la respuesta inmune confiere cierto beneficio al sujeto en que previene o reduce la incidencia de la enfermedad. Alternativamente, una respuesta inmune protectora o inmunidad protectora puede ser útil en el tratamiento de la enfermedad, particularmente cáncer o tumores (*por ejemplo*, al causar la regresión de un cáncer o tumor y/o al prevenir metástasis y/o prevenir el crecimiento de nódulos metastásicos). Los efectos protectores pueden ser completos o parciales, siempre y cuando los beneficios del tratamiento superen cualquier desventaja de los mismos.

De acuerdo con los métodos anteriores de inducir una respuesta inmune en un sujeto, el vector viral que comprende la secuencia nucleotídica heteróloga puede administrarse en una cantidad inmunogénicamente eficaz, como se describe más abajo.

Una "secuencia de nucleótidos heteróloga" o "ácido nucleico heterólogo" es una secuencia que no es de origen natural en el virus. Generalmente, el ácido nucleico heterólogo comprende un marco de lectura abierto que codifica un polipéptido o ARN de interés no traducido (*por ejemplo*, para su suministro a una célula o sujeto). La secuencia de nucleótidos heteróloga o ácido nucleico heterólogo puede también ser una secuencia de nucleótidos o ácido nucleico que no es de origen natural en una célula en la que se introduce, o la secuencia de nucleótidos heteróloga o ácido nucleico heterólogo puede ser una secuencia de nucleótidos o molécula de ácido nucleico que es la misma que una secuencia de nucleótidos o una molécula de ácido nucleico que es de origen natural, pero la secuencia de nucleótidos heteróloga o la molécula de ácido nucleico no está presente en la ubicación o posición donde se encuentra típicamente su contraparte de origen natural y/o está bajo el control de elementos regulatorios que difieren de los que regulan la expresión de la contraparte de origen natural.

Como se usa en la presente descripción, los términos "vector viral", "vector" o "vector de suministro génico" se refieren a una partícula de virus (*por ejemplo*, AAV) que funciona como vehículo de suministro de ácido nucleico y que comprende el genoma de vector (*por ejemplo*, ADN viral [ADNv]) empaquetados dentro de una cápsida de AAV. Alternativamente, en algunos contextos, el término "vector" puede usarse para referirse sólo al genoma/ADNv del vector.

Un "genoma del vector rAAV" o "genoma rAAV" es un genoma de AAV (*es decir.*, ADNv) que comprende una o más secuencias nucleotídicas heterólogas. Los vectores rAAV generalmente sólo requieren las TR repeticiones terminales de 145 bases en *cis* para generar el virus. Todas las otras secuencias víricas son prescindibles y pueden suministrarse en *trans* (Muzyczka, (1992) Curr. Topics Microbiol. Immunol. 158:97). Típicamente, el genoma del vector de rAAV sólo conservará las secuencias TR mínimas para maximizar el tamaño del transgén que puede ser eficazmente empaquetado por el vector. Las secuencias de codificación de las proteínas estructurales y no estructurales pueden proporcionarse en *trans* (*por ejemplo*, a partir de un vector, tal como un plásmido, o mediante la integración estable de las secuencias en una célula de empaquetamiento). El genoma del vector rAAV comprende al menos una secuencia TR (*por ejemplo*, secuencia AAV TR), opcionalmente dos TR (*por ejemplo*, dos AAV TR), que típicamente estarán en los extremos 5' y 3' de la secuencia o secuencias nucleotídicas heterólogas, pero no es necesario que sean contiguas a ellas. Las TR pueden ser iguales o diferentes entre sí.

Una "repetición terminal de AAV" o "AAV TR" puede ser de cualquier AAV, incluyendo pero sin limitarse a serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o 11 o cualquier otro AAV descubierto posteriormente o conocido en la actualidad. Las repeticiones terminales de AAV no necesitan tener una secuencia de repetición terminal silvestre (*por ejemplo*, una secuencia silvestre puede alterarse por inserción, delección, truncamiento o mutaciones de aminoácidos), mientras que la repetición terminal media las funciones deseadas, *por ejemplo*, replicación, empaque de virus, integración y/o rescate de provirus, y similares.

El término "repetición terminal" o "TR" incluye cualquier repetición terminal y secuencias sintéticas que forman estructuras de horquilla y funcionan como una repetición terminal invertida, tales como la "secuencia doble D" como se describe en la patente de Estados Unidos núm. 5,478,745 de Samulski y *otros*.

Las estructuras de la cápsida de parvovirus autónomos y AAV se describen con más detalle en BERNARD N. FIELDS y *otros*, VIROLOGY, volumen 2, capítulos 69 y 70 (4ta edición, Lippincott-Raven Publishers). *Ver además*, la descripción de la estructura cristalina de AAV2 (Xie y *otros*, (2002) Proc. Nat. Acad. Sci. 99:10405-10), AAV4 (Padron y *otros*, (2005) J. Virol. 79: 5047-58), AAV5 (Walters y *otros*, (2004) J. Virol. 78: 3361-71) y CPV (Xie y *otros*, (1996) J. Mol. Biol. 6:497-520 y Tsao y *otros*, (1991) Science 251: 1456-64).

Los vectores de virus de la invención pueden ser además vectores de virus "dirigidos" (*por ejemplo*, que tienen un tropismo dirigido) y/o un parvovirus "híbrido" (*es decir*, en el que el genoma de rAAV y la cápsida viral son de diferentes parvovirus) como se describe en la publicación de la patente internacional WO 00/28004 and Chao y *otros*, (2000) *Molecular Therapy* 2:619.

Los vectores virales de la invención pueden ser además partículas de parvovirus dúplex, tal como se describe en la publicación de patente internacional núm. WO 01/92551. Así, en algunas modalidades, los genomas bicatenarios (dúplex) pueden empacarse en las cápsidas virales de esta invención.

Además, la cápsida o genoma viral puede contener otras modificaciones, incluyendo inserciones, supresiones y/o sustituciones.

En consecuencia, como se usa en la presente descripción, el término "vector viral" abarca partículas virales híbridas, dirigidas y dúplex, así como otras formas modificadas de parvovirus y AAV.

El término "regular", "regula" o "regulación" se refiere a la mejora (*por ejemplo*, un aumento) o inhibición (*por ejemplo*, una disminución) en el nivel o actividad especificada.

El término "mejora" o "aumento" se refiere a un incremento en el parámetro especificado de al menos aproximadamente 1,25 veces, 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 8 veces, 10 veces, doce veces o incluso quince veces.

5 El término "inhibir" o "reducir" o variaciones gramaticales de los mismos, como se usa en la presente descripción se refiere a una reducción o disminución en el nivel o actividad especificada de al menos 15%, 25%, 35%, 40%, 50% , 60%, 75%, 80%, 90%, 95% o más. En modalidades particulares, la inhibición o reducción resulta en una actividad pequeña o esencialmente no detectable (como máximo, una cantidad insignificante, *por ejemplo*, menos de aproximadamente 10% o incluso 5%).

10 Como se usa en la presente descripción, "transducción" se refiere a la entrada de un virus en la célula y la expresión (por ejemplo, transcripción y/o traducción) de secuencias suministradas por el genoma. En el caso de un vector recombinante, la "transducción" se refiere generalmente, a la entrada del virus recombinante en la célula y a la expresión de un ácido nucleico de interés suministrado por el genoma del vector.

15 Como se usa en la presente descripción, "transgén" se refiere a cualquier secuencia de ácido nucleico usada en la transfección o transducción (*es decir*, transformación) de una célula, que puede ser una célula *in vitro* o una célula en un organismo. Así, un transgén puede ser una secuencia codificante, una secuencia no codificante, un ADNc, un gen o fragmento o parte del mismo, una secuencia genómica, un elemento regulador y similares. Un organismo "transgénico", tal como una planta transgénica o un animal transgénico, es un organismo en el que se introdujo o suministró un transgén y el transgén puede expresarse en el organismo transgénico para producir un producto, cuya presencia puede impartir un efecto (*por ejemplo*., un efecto terapéutico o beneficioso) y/o un fenotipo (*por ejemplo*, un fenotipo deseado o alterado) en el organismo.

25 Además, como se usa en la presente descripción, un genoma del vector de AAV que está "sobredimensionado" con relación a un genoma de AAV silvestre es un genoma de AAV que es mayor que 4680 nucleótidos (4,68 kb), que es el tamaño del genoma de AAV silvestre. Tal genoma del vector de AAV sobredimensionado puede ser, por ejemplo, 4,7 kb, 4,8 kb, 4,9 kb, 5,0 kb, 5,1 kb, 5,2 kb, 5,3 kb, 5,4 kb, 5,5 kb, 5,6 kb, 5,7 kb, 5,8 kb, 5,9 Kb, 6,0 kb, 6,1 kb, 6,2 kb, o 6,3 kb, etc.

30 La transducción "mejorada" o "aumentada" (y términos similares) se refiere a cualquier aumento en la transducción que sea útil, *por ejemplo*, para propósitos de laboratorio y/o clínicos. En modalidades particulares, las composiciones y métodos de la presente invención mejoran o aumentan la transducción de vectores de parvovirus en al menos aproximadamente 10%, 15%, 20% 25%, 30%, 40%, 50%, 60% 75%, 90% , 100%, 150%, 200%, 250%, 300%, etc., así como, en al menos aproximadamente 2 veces, 3 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces, 25 veces, 50 veces, 75 veces, 100 veces, 500 veces, 1000 veces, 2000 veces, 5000 veces o más. La mejora o aumento de la transducción de los parvovirus de esta invención puede ser relativa a un control o estándar como se conoce bien en la técnica y como se describe en la presente descripción.

40 La expresión "mejorada" o "aumentada" (y términos similares) se refiere a cualquier aumento en la expresión de una molécula de ácido nucleico heteróloga de esta invención que sea útil, *por ejemplo*, para propósitos de laboratorio y/o clínicos. En modalidades particulares, las composiciones y métodos de la presente invención mejoran o aumentan la expresión de ácido nucleico heterólogo presente en vectores de parvovirus de esta invención en al menos aproximadamente 10%, 15%, 20% 25%, 30%, 40%, 50 % , 60% 75%, 90%, 100%, 150%, 200%, 250%, 300%, etc., así como en al menos aproximadamente 2 veces, 3 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces, 25 veces, 50 veces, 75 veces, 100 veces, 500 veces, 1000 veces, 2000 veces, 5000 veces o más. La mejora o aumento en la expresión de una molécula de ácido nucleico heteróloga de esta invención puede ser con relación a un control o estándar como se conoce bien en la técnica y como se describe en la presente descripción.

50 Una cantidad "terapéuticamente eficaz" como se usa en la presente descripción es una cantidad que es suficiente para proporcionar alguna mejora o beneficio para el sujeto. Alternativamente se declara que, una cantidad "terapéuticamente eficaz" es una cantidad que proporcionará algún alivio, mitigación o disminución en al menos un síntoma clínico en el sujeto. Aquellos con experiencia en la técnica apreciarán que los efectos terapéuticos no necesitan ser completos o curativos, siempre y cuando algún beneficio se proporciona al sujeto.

55 En algunas modalidades, las células que se han transducido con un vector viral se pueden administrar para inducir una respuesta inmunogénica contra el polipéptido suministrado (*por ejemplo*, expresado como un transgén o en la cápsida). Típicamente, se administra una cantidad de células que expresan una cantidad inmunogénicamente eficaz del polipéptido en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable. Una "cantidad inmunogénicamente eficaz" es una cantidad del polipéptido expresado que es suficiente para evocar una respuesta inmune activa en el sujeto al que se administra la formulación farmacéutica. En modalidades particulares, la dosificación es suficiente para producir una respuesta inmune protectora (como se define en la presente invención). El grado de protección conferido no necesita ser completo o permanente, siempre que los beneficios de administrar el polipéptido inmunogénico superen cualquiera de las desventajas de los mismos.

65

- La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que los genomas de vectores de parvovirus recombinantes que difieren sustancialmente del tamaño silvestre pueden empacarse en viriones e infectar células objetivo; sin embargo, la transducción por estos viriones se reduce en los puntos después de la entrada en la célula objetivo. Sin estar limitado por ninguna teoría particular de la invención, se cree que la transducción por tales vectores se inhibe al menos en parte por mecanismos de tráfico intracelular y/o síntesis de la segunda cadena.
- Los inventores encontraron que los inhibidores del proteasoma pueden mejorar la transducción por vectores de parvovirus, incluyendo aquellos que suministran genomas de vectores que difieren sustancialmente en tamaño del genoma silvestre. Ver, por ejemplo, Hirsch y otros "Little vector, big gene transduction: fragmented genome reassembly of adeno-associated virus" *Molecular Therapy* 18(1):6-8 (2010); Johnson & Samulski "Enhancement of adeno-associated virus infection by mobilizing capsids into and out of the nucleolus" *J. Virol.* 83(6):2632-2644 (2009); y Grieger y Samulski "Packaging capacity of adeno-associated virus serotypes: impact of larger genomes on infectivity and postentry steps" *J. Virol.* 79(15):9933-9944 (2005).
- En consecuencia, como un aspecto, la invención proporciona una composición que comprende: (a) un vector de parvovirus que comprende un ácido nucleico heterólogo de interés; y (b) un inhibidor del proteasoma, como se define en la reivindicación 1. En modalidades particulares, el vector de parvovirus es un vector de parvovirus AAV/autónomo híbrido, *por ejemplo*, que comprende un genoma del vector de AAV y una cápsida de parvovirus autónoma o viceversa. El vector de parvovirus puede ser además, un vector de parvovirus quimérico o dirigido (*ver*, por ejemplo, el documento WO 00/28004 y Chao y otros, (2000) *Molecular Therapy* 2:619).
- En algunas modalidades particulares, el parvovirus comprende un genoma que no difiere sustancialmente en tamaño del tamaño del genoma silvestre. En otras modalidades, el tamaño del genoma difiere sustancialmente del tamaño silvestre (*por ejemplo*, menos de aproximadamente 80 a 85% y mayor que aproximadamente 105 a 107% de tamaño silvestre).
- En otras modalidades representativas, el parvovirus (*por ejemplo*, un AAV) comprende un genoma del vector de AAV que es mayor que aproximadamente 5,0, 5,2, 5,3, 5,4, o 5,5 kb y/o menos de aproximadamente 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4 o 6,5 kb de tamaño. En modalidades particulares, el genoma del vector de AAV es mayor que aproximadamente 5,2 kb e inferior a aproximadamente 6,1 kb. En otras modalidades adicionales, el parvovirus (*por ejemplo*, un AAV) comprende un genoma del vector de AAV que es menor que aproximadamente 4,0, 3,9, 3,8, 3,7 o 3,6 kb de tamaño.
- De acuerdo con la presente invención, el vector de parvovirus puede comprender un genoma del vector monocatenario. Alternativamente, el vector de parvovirus puede comprender un genoma del vector bicatenario. Se han descrito vectores de AAV bicatenarios, *ver*, *por ejemplo*, publicación de la patente internacional núm. WO 01/92551.
- La presente invención abarca además un vector de AAV transgén dividido, como se conoce en la técnica. (*Ver*, por ejemplo, Chao y otros "Expression of human factor VIII by splicing between dimerized AAV vectors" *Mol Ther* 5(6):716-722 (2002); Sarkar y otros "Total correction of hemophilia A mice with canine FVIII using an AAV8 serotype" *Blood* 103(4):1253-60 (2003); Chen y otros "The enhancing effects of the light chain on heavy chain secretion in split delivery of factor VIII gene" *Mol Ther* 15(10):1856-62 (2007); Lostal y otros "Efficient recovery of dysferlin deficiency by dual adeno-associated vector-mediated gene transfer" *Hum Mol Genet* 19(10):1897-1907 (2010); Halbert y otros "Efficient mouse airway transduction following recombination between AAV vectors carrying parts of a larger gene" *Nat Biotechnol* 20(7):697-701 (2002)).
- En cuanto a lo que se refiere la descripción realizada, el inhibidor del proteasoma puede ser cualquier inhibidor del proteasoma descubierto posteriormente o conocido en la actualidad, incluyendo inhibidores de péptidos análogos y de moléculas pequeñas. Numerosos inhibidores del proteasoma se conocen en la técnica, y algunos se han usado en la terapia del cáncer. En modalidades particulares, el inhibidor del proteasoma inhibe proteasomas que (1) escinden después de cadenas laterales hidrófobas (tipo quimotripsina), (2) escinden después de cadenas laterales ácidas (postglutamilpeptidasa), (3) escinden después de cadenas laterales básicas (tipo tripsina), (4) escinden después de los aminoácidos de cadena ramificada (actividad BrAAP) o (5) escinden después de pequeños aminoácidos neutros (actividad SNAAP).
- En modalidades representativas, el inhibidor de proteasoma es (1) un aldehído peptídico C-terminal, (2) un péptido vinilsulfona (*por ejemplo*, un péptido modificado en el terminal C por una porción vinilsulfona), (3) lactacisina, (4) un aldehído di- o tripéptido, (5) un péptido éster de boro, (6) un péptido α -ceto-carbonilo, (7) una α , β -epoxicetona o (8) un derivado de antraciclina.
- En otras modalidades particulares, el inhibidor del proteasoma incluye uno o más de los siguientes: *N*-acetil-L-leucil-L-leucil-L-norleucina (LLnL), MG-132, PS-341 (bortezomib or Velcade™), doxorubicina, aclarubicina, aclacinomicina A, AdaAhx₃L₃VS, AdaLys(Bio)Ahx₃L₃VS, ALLM, ALLN, epoxomicina, α -metilomuralida, MG-115, NLVS, NP-LLL-VS, inhibidor del proteasoma I, inhibidor del proteasoma II, inhibidor del proteasoma III, inhibidor del proteasoma IV, inhibidor del proteasoma VII, tiroeptina A o YU101. Numerosos inhibidores del proteasoma están disponibles de las fuentes comerciales tales como Calbiochem y Millenium Pharmaceuticals, Inc.

En algunas modalidades, el inhibidor del proteasoma de esta invención puede administrarse con dexametasona y en algunas modalidades, el inhibidor del proteasoma puede administrarse en ausencia de administración de la dexametasona.

5

Los inhibidores del proteasoma se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en Bogoy y otros (1997) *Biopoly* 43:269-280).

10

El vector de parvovirus puede comprender cualquiera de las secuencias de ácido nucleico heteróloga de interés. Las secuencias de ácidos nucleicos de interés incluyen secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos, incluyendo polipéptidos terapéuticos (*por ejemplo*, para usos médicos o veterinarios) o inmunogénicos (*por ejemplo*, para vacunas).

15

Como se usa en la presente descripción, una secuencia de nucleótido o ácido nucleico heterólogo que comprende una secuencia codificante que se ha optimizado con relación a una secuencia codificante silvestre (*por ejemplo*, una secuencia codificante para FVIII o distrofina) describe una secuencia codificante que se ha optimizado de acuerdo con los protocolos bien conocidos en la técnica para, *por ejemplo*, minimizar el uso de codones raros (*por ejemplo*, codones humanos), eliminar marcos de lectura alternativos, etc., como puede conocerse en la técnica (*por ejemplo*, como se describe en el documento núm. PCT/US2007/071553).

20

Además como se usa en la presente descripción, una secuencia de nucleótidos o ácido nucleico heterólogo que comprende secuencias no codificantes que se han optimizado con respecto a las secuencias no codificantes silvestres describe una secuencia de nucleótidos y ácido nucleico heterólogo que comprende secuencias no codificantes que se optimizaron de acuerdo con los protocolos bien conocidos en la técnica, *por ejemplo*, para mejorar la actividad del promotor, la señal poli A, las repeticiones terminales y/u otros elementos no codificantes, así como para modular la actividad y/o función de los elementos *cis* y elementos *trans* implicados en la expresión génica, la regulación y/o producción, etc., como se conoce bien en la técnica.

25

Además, como se usa en la presente descripción, un genoma del vector de AAV que se ha optimizado con relación a un genoma de vector de AAV silvestre describe un vector de AAV en el que el genoma se ha optimizado para mejorar la actividad de elementos virales *cis* requeridos para la replicación, y/o suministro, etc., como se conoce bien en la técnica. Un vector de AAV optimizado de ese tipo puede comprender un casete de transcripción optimizado, repeticiones terminales optimizadas, etc., como se conoce bien en la técnica.

30

Los polipéptidos terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, la proteína reguladora transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), distrofina (incluyendo el producto proteico de los minigenes de la distrofina, *ver, por ejemplo*, Vincent y otros, (1993) *Nature Genetics* 5:130; la publicación de la patente de los Estados Unidos núm. 2003/017131, utrofina (Tinsley y otros, (1996) *Nature* 384:349), factores de la coagulación y proteínas reguladoras de los factores de la coagulación (*por ejemplo*, Factor VIII, Factor IX, Factor X, factor von Willebrand, ADAMTS 13, etc.), eritropoyetina, angiostatina, endostatina, catalasa, tirosina hidroxilasa, superóxido dismutasa, leptina, receptor LDL, lipoproteína lipasa, ornitina transcarbamilasa, β -globina, α -globina, espectrina, α_1 -antitripsina, adenosina desaminasa, hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa, β -glucocerebrosidasa, esfingomielinasa, hexosaminidasa A lisosomal, deshidrogenasa de cetoácidos de cadena ramificada, proteína RP65, citocinas (*por ejemplo*, interferón β , interferón- γ , interleucina-2, interleucina-4, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, linfotoxinas, y similares), factores de crecimiento de péptidos, factores neurotróficos y hormonas (*por ejemplo*, somatotropina, insulina, factores de crecimiento similares a insulina 1 y 2, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento nervioso, factor neurotrófico 3 y 4, factor neurotrófico derivado del cerebro, proteínas morfogénicas óseas [incluyendo RANKL y VEGF], factor de crecimiento derivado de glial, factor de crecimiento transformante α y β y similares), α -glucosidasa ácida lisosomal, α -galactosidasa A, receptores (*por ejemplo*, receptor soluble de factor α de crecimiento de necrosis tumoral), factores antiinflamatorios tales como IRAP, proteínas anti-miostatina, aspartoacilasa, anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales monocatenarios; un AcM ilustrativo es el AcM de herceptina. Otras secuencias de ácido nucleico heterólogas ilustrativas codifican productos génicos suicidas (*por ejemplo*, timidina quinasa, citosina desaminasa, toxina diftérica y factor de necrosis tumoral), proteínas que confieren resistencia a un fármaco usado en la terapia de cáncer, productos génicos supresores de tumores (*por ejemplo*, p53, Rb, Wt-1), TRAIL, ligando FAS y cualquier otro polipéptido que tenga un efecto terapéutico en un sujeto que lo necesite.

55

Generalmente, la presente invención puede emplearse para suministrar cualquier ácido nucleico heterólogo con un efecto biológico para tratar o mejorar los síntomas asociados con cualquier trastorno relacionado con la expresión génica. Alternativamente, la invención puede usarse para tratar cualquier estado patológico para el que sea beneficioso administrar un polipéptido terapéutico. Los estados patológicos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a: fibrosis quística (proteína reguladora transmembrana de fibrosis quística) y otras enfermedades del pulmón, hemofilia A (Factor VIII), hemofilia B (Factor IX), talasemia (β -globina), anemia (Eritropoyetina) y otros trastornos sanguíneos, enfermedad de Alzheimer (GDF; neprilisina), esclerosis múltiple (β -interferón), enfermedad de Parkinson (factor neurotrófico derivado de la línea celular glial [GDNF]), enfermedad de Huntington (ARNi para eliminar repeticiones), esclerosis lateral amiotrófica, epilepsia (galanina, factores neurotróficos), y otros trastornos neurológicos, cáncer (endostatina,

60

65

angiostatina, TRAIL, ligando FAS, citocinas incluyendo interferones, ARNi incluyendo ARNi contra VEGF o producto génico resistente a múltiples fármacos), diabetes mellitus (insulina), distrofias musculares incluyendo Duchenne (distrofina, mini-distrofina, factor de crecimiento similar a la insulina I, un sarcoglicano [*por ejemplo*, α , β , γ], ARNi contra miostatina) y enfermedad de Becker, Gaucher (glucocerebrosidasa), enfermedad de Hurler (α -L-iduronidasa),
 5 deficiencia de la adenosina desaminasa (adenosina desaminasa), enfermedades de almacenamiento de glucógeno (*por ejemplo*, enfermedad de Fabry [α -galactosidasa] y enfermedad de Pompe [α -glucosidasa ácida lisosomal]) y otros defectos metabólicos, enfisema congénito (α 1-antitripsina), síndrome de Lesch-Nyhan (hipoxantina guanina fosforibosiltransferasa), enfermedad de Niemann-Pick (esfingomielinasa), enfermedad de Tays Sachs (hexosaminidasa A lisosomal), enfermedad de la orina con olor a jarabe de arce (deshidrogenasa de cetoácidos de cadena ramificada),
 10 enfermedades degenerativas de la retina (y otras enfermedades del ojo y de la retina; *por ejemplo*, PDGF para la degeneración macular), enfermedades de órganos sólidos tales como cerebro (incluyendo enfermedad de Parkinson [GDNF], astrocitomas [endostatina, angiostatina y/o ARNi contra VEGF], glioblastomas [endostatina, angiostatina y/o ARNi contra VEGF] hígado, riñón, corazón incluyendo insuficiencia cardíaca congestiva o enfermedad arterial periférica (PAD) (*por ejemplo*, suministrando el inhibidor de fosfatasa proteínica I (I-1), fosfolambano, serca2a, proteínas de dedo de zinc que regulan el gen fosfolambano, Barkct, receptor β 2-adrenérgico, cinasa del receptor β 2-adrenérgico (BARK), fosfoinositida-3 cinasa (PI3 cinasa), cal sarcina, etc.); artritis (factores de crecimiento similares a insulina), trastornos de las articulaciones (factores de crecimiento similares a insulina), hiperplasia de la íntima, (*por ejemplo*, suministrando enos, inos), supervivencia mejorada de trasplantes cardíacos (superóxido dismutasa), SIDA (CD4 soluble), desgaste muscular (factor I de crecimiento similar a la insulina), deficiencia renal (eritropoyetina), anemia (eritropoyetina), artritis (factores antiinflamatorios tales como IRAP y receptor soluble de TNF α), hepatitis (α -interferón), deficiencia de receptor de LDL (receptor de LDL), hiperamonemia (ornitina transcarbamilasa), enfermedad de Krabbe (galactocerebrosidasa),
 15 enfermedad de Batten, ataxias cerebrales espinales incluyendo SCA1, SCA2 y SCA3, fenilcetonuria (fenilalanina hidroxilasa), enfermedades autoinmunes y similares. La invención puede usarse además a continuación del trasplante de órganos para aumentar el éxito del trasplante y/o reducir los efectos secundarios negativos de trasplantes de órganos o terapias adjuntas (*por ejemplo*, mediante la administración de agentes inmunosupresores o ácidos nucleicos inhibidores para bloquear la producción de citocinas). Como otro ejemplo, las proteínas morfogénicas óseas (incluyendo RANKL y/o VEGF) se pueden administrar con un aloinjerto óseo, por ejemplo, después de una interrupción o extracción quirúrgica en un paciente de cáncer.

30 Las secuencias nucleotídicas heterólogas que codifican polipéptidos incluyen aquellas que codifican polipéptidos reporteros (*por ejemplo*, una enzima). Polipéptidos reporteros se conocen en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, proteína de fluorescencia verde, beta-galactosidasa, fosfatasa alcalina, luciferasa y gen de cloranfenicol-acetiltransferasa.

35 Alternativamente, el ácido nucleico puede codificar un ácido nucleico antisentido, una ribozima (*por ejemplo*, como se describe en la Patente de los Estados Unidos núm. 5.877.022), los ARN que efectúan el empalme *trans*mediado por espliceosoma (*ver*, Puttaraju y otros, (1999) Nature Biotech. 17:246; Patente de los Estados Unidos núm. 6.013.487; Patente de los Estados Unidos núm. 6.083.702), los ARN interferentes (ARNi) incluyendo ARNsi que median el silenciamiento de genes (*ver*, Sharp y otros, (2000) Science 287:2431) u otros ARN no traducidos, tales como los ARN "guía" (Gorman y otros, (1998) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 95:4929; Patente de los Estados Unidos núm. 5.869.248 otorgada a Yuan y otros), y similares. Los ARN no traducidos ilustrativos incluyen ARNi contra el producto génico de resistencia a múltiples fármacos (MDR) (*por ejemplo*, para tratar tumores y/o para la administración al corazón para prevenir el daño por quimioterapia), ARNi contra miostatina (distrofia muscular de Duchenne) o ARNi contra VEGF (*por ejemplo*, para tratar tumores).
 45

El vector de virus puede comprender además un ácido nucleico que comparte homología con y se recombina con un locus en el cromosoma huésped. Este enfoque se puede utilizar para corregir un defecto genético en la célula huésped.

50 El ácido nucleico heterólogo puede codificar adicionalmente un polipéptido inmunogénico, *por ejemplo*, para la vacunación. El ácido nucleico puede codificar cualquier inmunógeno de interés conocido en la técnica, incluyendo, pero no se limitan a, inmunógenos del virus de inmunodeficiencia humana (HIV), virus de inmunodeficiencia de simios (SIV), virus de la influenza, proteínas gag de HIV o SIV, antígenos tumorales, antígenos cancerígenos, antígenos bacterianos, antígenos virales, y similares.

55 El uso de parvovirus como vacunas es conocido en la técnica (*ver, por ejemplo*, Miyamura y otros, (1994) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 91:8507; Patente de los Estados Unidos núm. 5.916.563 otorgada a Young y otros, 5.905.040 otorgada a Mazzara y otros, Patente de los Estados Unidos núm. 5.882.652, Patente de los Estados Unidos núm. 5.863.541 otorgada a Samulski y otros; cuyas descripciones se incorporan en la presente descripción en su totalidad como referencia). El antígeno puede presentarse en la cápsida del parvovirus. Alternativamente, el antígeno puede expresarse a partir de un ácido nucleico heterólogo introducido en un genoma del vector recombinante.
 60

Un polipéptido inmunogénico, o inmunógeno, puede ser cualquier polipéptido adecuado para proteger al sujeto contra una enfermedad, que incluye, pero no se limita a, enfermedades microbianas, bacterianas, protozoáricas, parasitarias, fúngicas y/o virales. Por ejemplo, el inmunógeno puede ser un inmunógeno de ortomixovirus (*por ejemplo*, un inmunógeno del virus de la influenza, tales como la proteína de superficie hemaglutinina (HA) del virus de la influenza o
 65

la nucleoproteína del virus de la influenza, o un inmunógeno del virus de la influenza equina), o un inmunógeno de lentivirus (*por ejemplo*, un inmunógeno del virus de la anemia infecciosa equina, un inmunógeno del virus de la inmunodeficiencia de simios (SIV), o un inmunógeno del virus inmunodeficiencia humana (HIV), tales como la proteína GP160 de la envoltura de HIV o SIV, las proteínas de la matriz/cápsida de HIV o SIV y los productos génicos de *gag*, *pol* y *env* de HIV o SIV). El inmunógeno puede ser además un inmunógeno de arnavirus (*por ejemplo*, inmunógeno del virus de la fiebre de Lassa, tal como la proteína de la nucleocápsida del virus de la fiebre de Lassa y la glicoproteína de envoltura de la fiebre de Lassa), un inmunógeno del poxvirus (*por ejemplo*, vaccinia, tales como productos génicos L1 o L8 de vaccinia), un inmunógeno de flavivirus (*por ejemplo*, un inmunógeno del virus de la fiebre amarilla o un inmunógeno del virus de la encefalitis japonesa), un inmunógeno de filovirus (*por ejemplo*, un inmunógeno del virus de Ebola, o un inmunógeno del virus de Marburg, tales como los productos génicos NP y GP), un inmunógeno de bunyavirus (*por ejemplo*, virus RVFV, CCHF, y SFS), o un inmunógeno de coronavirus (*por ejemplo*, un inmunógeno de coronavirus infeccioso humano, tales como la glicoproteína de envoltura del coronavirus humano, o un inmunógeno del virus de gastroenteritis transmisible porcino, o un inmunógeno del virus de la bronquitis infecciosa aviar). El inmunógeno puede ser además un inmunógeno de la polio, inmunógeno de herpes (*por ejemplo*, inmunógenos de CMV, EBV, HSV) inmunógeno de las papeas, inmunógeno del sarampión, inmunógeno de la rubeola, inmunógeno de la toxina de la difteria u otro inmunógeno de la difteria, antígeno pertussis, inmunógeno de la hepatitis (*por ejemplo*, hepatitis A, hepatitis B o hepatitis C), o cualquier otro inmunógeno de vacunas que se conocen en la técnica.

Alternativamente, el inmunógeno puede ser cualquier antígeno de célula de tumor o cáncer. Preferentemente, el antígeno de tumor o cáncer se expresa en la superficie de la célula del cáncer. Los antígenos de célula de cáncer y tumor ilustrativos se describen en S. A. Rosenberg, (1999) *Immunity* 10:281). Otros antígenos de cáncer y tumor ilustrativos incluyen, pero no se limitan a: el producto génico BRCA1, producto génico BRCA2, gp100, tirosinasa, GAGE-1/2, BAGE, RAGE, NY-ESO-1, CDK-4, β -catenina, MUM-1, Caspasa-8, KIAA0205, HPVE, SART-1, PRAME, p15, antígenos tumorales de melanoma (Kawakami y otros, (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:3515; Kawakami y otros, (1994) *J. Exp. Med.*, 180:347; Kawakami y otros, (1994) *Cancer Res.* 54:3124) incluyendo MART-1 (Coulie y otros, (1991) *J. Exp. Med.* 180:35), gp100 (Wick y otros, (1988) *J. Cutan. Pathol.* 4:201) y antígeno MAGE, MAGE-1, MAGE-2 y MAGE-3 (Van der Bruggen y otros, (1991) *Science*, 254:1643); CEA, TRP-1, TRP-2, P-15 y tirosinasa (Brichard y otros, (1993) *J. Exp. Med.* 178:489); producto génico HER-2/neu (Patente de los Estados Unidos núm. 4,968,603), CA 125, LK26, FB5 (endosialina), TAG 72, AFP, CA19-9, NSE, DU-PAN-2, CA50, SPan-1, CA72-4, HCG, STN (antígeno sialil Tn), proteínas c-erbB-2, PSA, L-CanAg, receptor de estrógenos, globulina de la grasa de leche, proteína supresora de tumores p53 (Levine, (1993) *Ann. Rev. Biochem.* 62:623); antígenos de mucina (publicación de patente internacional WO 90/05142); telomerasas; proteínas de matriz nuclear; fosfatasa ácida prostática; antígenos del virus del papiloma; y antígenos asociados con los siguientes cánceres: melanomas, adenocarcinoma, timoma, linfoma, sarcoma, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de colon, linfoma no Hodgkin, linfoma de Hodgkin, leucemias, cáncer de útero, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer cervical, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de páncreas y otros (*ver, por ejemplo*, Rosenberg, (1996) *Ann. Rev. Med.* 47:481-91).

Alternativamente, la secuencia de nucleótido heteróloga puede codificar cualquier polipéptido que se produce de manera conveniente en una célula *in vitro*, *ex vivo*, o *in vivo*. Por ejemplo, los vectores de parvovirus pueden introducirse en las células cultivadas y el producto génico expresado aislarse de las mismas.

Se entenderá por los expertos en la técnica que los ácidos nucleicos heterólogos de interés pueden asociarse operativamente con secuencias de control adecuadas. Por ejemplo, el ácido nucleico heterólogo puede asociarse operativamente con elementos de control de la expresión, tales como señales de control de la transcripción/traducción, orígenes de replicación, señales de poliadenilación y sitios interno de entrada al ribosoma (IRES), promotores, potenciadores, y similares.

Los expertos en la técnica apreciarán que una variedad de elementos promotores/potenciadores puede usarse en dependencia del nivel y expresión específica al tejido deseado. El promotor/potenciador puede ser constitutivo o regulable, en dependencia del patrón de expresión deseado. El promotor/potenciador puede ser nativo o extraño y puede ser una secuencia natural o una sintética. Por extraña, se pretende que la región de iniciación transcripcional no se encuentra en el huésped silvestre en el que se introduce la región de iniciación transcripcional.

El elemento promotor/potenciador puede ser nativo para la célula objetivo o sujeto que se trata y/o puede ser nativo para el ácido nucleico heterólogo. El elemento promotor/potenciador se elige generalmente de manera que funcione en las células objetivos de interés. El elemento promotor/potenciador puede ser opcionalmente un elemento promotor/potenciador de mamífero. El elemento promotor/potenciador puede ser además constitutivo o regulable.

La presente invención facilita la inclusión de elementos de control de la expresión regulables en vectores de parvovirus, los cuales han sido previamente restringidos debido a limitaciones de tamaño. Los elementos promotores/potenciadores regulables para el suministro de ácidos nucleicos pueden ser elementos promotores/potenciadores específicos al tejido, e incluyen elementos promotores/potenciadores específico al músculo (incluyendo músculo cardíaco, esquelético y/o liso), específico al tejido neural (incluyendo específico al cerebro), ojo (incluyendo específico a la retina y específico a la córnea) específico al hígado, específico a la médula ósea, específico al páncreas, específico al bazo, y específico a pulmón. Otros elementos promotores/potenciadores inducibles incluyen elementos inducibles a hormonas e inducibles a

metales. Los elementos promotores/potenciadores inducibles ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, un elemento de activación/desactivación Tet, un promotor inducible a RU486, un promotor inducible a ecdisona, un promotor inducible a rapamicina y un promotor a metalotioneína.

5 En las modalidades en donde cuyas secuencias de ácidos nucleicos heterólogos se transcribirán y traducirán después en las células objetivo, las señales específicas de iniciación pueden necesitarse para la traducción eficiente de las secuencias codificadoras de la proteína insertada. Estas secuencias exógenas de control de la traducción, que pueden incluir el codón de iniciación ATG y secuencias adyacentes, pueden ser de una variedad de orígenes, tanto natural como sintético.

10 No existe límites particulares al tamaño del ácido nucleico heterólogo. En modalidades particulares, la secuencia de ácido nucleico heterólogo es al menos aproximadamente 15, 18, 24, 50, 100, 250, 500, 1000 o más largo de nucleótidos.

15 La invención proporciona además formulaciones farmacéuticas que comprenden una composición de la invención en un portador farmacéuticamente aceptable. Por "farmacéuticamente aceptable" se entiende un material que no es biológicamente o de lo contrario indeseable, es decir, el material puede administrarse a un sujeto junto con las partículas seleccionadas, y/o sus poblaciones, sin causar efectos biológicos perjudiciales sustanciales o interactuar de manera perjudicial con cualquiera de los otros componentes de la composición en la que se contiene. El portador farmacéuticamente aceptable es adecuado para la administración o suministro a los humanos y otros sujetos de esta invención. El portador, podría seleccionarse naturalmente para minimizar cualquier degradación del ingrediente activo y para minimizar cualquier efecto secundario adverso en el sujeto, que serían bien conocidos por un experto en la técnica (ver, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Science*; última edición). Las formulaciones farmacéuticas, tales como vacunas u otras composiciones inmunogénicas de la presente invención, pueden comprender una cantidad

20 farmacéuticamente aceptable de las partículas PIV de esta invención, en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable. Los portadores farmacéuticamente aceptables ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, agua estéril libre de pirógeno, y solución salina regulada con fosfato estéril libre de pirógeno.

25 La invención proporciona además métodos in vitro para suministrar un ácido nucleico de interés a una célula, los métodos que comprenden el contacto de la célula con un vector de parvovirus que comprende el ácido nucleico de interés y un inhibidor del proteasoma.

30 La descripción proporciona métodos para suministrar un ácido nucleico de interés a un sujeto, los métodos que comprenden administrar un vector de parvovirus que comprende el ácido nucleico de interés y un inhibidor del proteasoma al sujeto.

35 El vector de parvovirus y el inhibidor del proteasoma pueden administrarse por separado o en la misma composición, opcionalmente una formulación farmacéutica. Cuando se administran por separado, el vector de parvovirus y el inhibidor del proteasoma pueden administrarse opcionalmente de manera simultánea (*por ejemplo*, dentro de unos minutos u horas entre sí).

40 La presente invención encuentra uso tanto en aplicaciones veterinarias como médicas. Los sujetos adecuados incluyen tanto aves como mamíferos. El término "aviar" como se usa en la presente descripción incluye, pero no se limita a, gallinas, patos, gansos, codornices, pavos, faisán, loros, periquitos. El término "mamífero" como se usa en la presente descripción incluye, pero no se limita a, humanos, primates no humanos, bovinos, ovinos, caprinos, equinos, felinos, caninos, lagomorfos, etc. Los sujetos humanos incluyen neonatos, infantes, jóvenes, y adultos.

45 Las dosificaciones de los vectores de parvovirus que se administran a un sujeto dependerán del modo de administración, del tejido u órgano objetivo, la enfermedad o afección que se trata, del estado del sujeto individual, del vector viral particular y de ácido nucleico que se suministra, y puede determinarse de manera rutinaria. Las dosis ilustrativas para lograr los efectos terapéuticos son títulos de virus de al menos aproximadamente 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^3 , 10^{14} , 10^{15} unidades de transducción o más, preferentemente aproximadamente 10^6 , 10^7 o 10^8 hasta 10^{12} o 10^{13} unidades de transducción.

50 Igualmente, la dosis de inhibidor del proteasoma puede determinarse rutinariamente y variará con la vía de administración, el tejido o el órgano objetivo, el inhibidor del proteasoma particular, el sujeto y otros parámetros que están dentro del alcance del trabajador experto. Generalmente, el inhibidor del proteasoma se administra en una cantidad efectiva para potenciar la transducción por el vector de parvovirus.

55 En modalidades particulares, puede emplearse más de una administración (*por ejemplo*, dos, tres, cuatro o más administraciones) ya sea del vector, el inhibidor del proteasoma o ambos, para lograr el nivel deseado de expresión del ácido nucleico durante un período de varios intervalos, *por ejemplo*, diarios, semanales, mensuales, anuales, etc.

60 Los modos de administración ilustrativos incluyen la administración oral, rectal, transmucosa, tópica, intranasal, intratecal, intraocular, transdérmica, inhalatoria, parenteral (*por ejemplo*, intravenosa, subcutánea, intradérmica,

intramuscular [incluyendo la administración al músculo cardíaco, esquelético y/o diafragma], y el intraarticular), y similares, así como la inyección directa al tejido u órgano.

5 En modalidades particulares, la descripción se practica para tratar un sujeto que tiene o está en riesgo de padecer una
afección que incluye pero no se limita a: una distrofia muscular [que incluye la distrofia muscular de Duchenne o
Becker], hemofilia A, hemofilia B, esclerosis múltiple, diabetes mellitus, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Fabry,
enfermedad de Pompe, cáncer, artritis, pérdida de músculo, enfermedad cardíaca [incluyendo insuficiencia cardíaca
congénita o enfermedad de la arteria periférica], hiperplasia intimal, un trastorno neurológico [que incluye epilepsia],
10 enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson o enfermedad de Alzheimer, una enfermedad autoinmune, fibrosis
quística, talasemia, enfermedad de Hurler, enfermedad de Krabbe, fenilcetonuria, enfermedad de Batten, ataxia cerebral
espinal, deficiencia de receptor de LDL, hiperamonemia, anemia, artritis, un trastorno degenerativo de la retina que
incluye degeneración macular, deficiencia de adenosina deaminasa o cáncer [que incluye los cánceres que forman
tumor].

15 La invención a la que se refiere esta descripción se explicará con mayor detalle en los siguientes ejemplos, que se
incluyen en la presente descripción sólo con propósitos ilustrativos y que no pretenden limitar la invención.

EJEMPLOS

20 Ejemplo 1. Estudios con los vectores de AAV2 y AAV8

El suministro de genes que son más grandes que el genoma de 4680 nucleótidos del virus adenoasociado silvestre
(AAV) es ineficiente usando vectores de AAV. En este estudio, se usó un casete de expresión de factor VIII de 5,6 kb
empaquetado en AAV para probar el efecto de un tratamiento del inhibidor del proteasoma aprobado por la FDA
25 (bortezomib) simultáneo con el suministro del vector *in vivo*. El suministro de vectores intrahepáticos resultó en la
expresión del factor VIII que persistió durante más de un año de seguimiento en ratones hemofílicos. Una dosis única de
bortezomib administrada con el vector del factor VIII AAV2 o AAV8 mejoró la expresión en promedio ~600% y ~300%,
respectivamente. Además, la coadministración de AAVB. Canino FVIII (1×10^{13} vg/kg) y bortezomib en perros con
hemofilia A (n=4) resultó en la normalización completa del Tiempo de Coagulación de la Sangre Total (WBCT) y una
30 reducción del 90% en la frecuencia de sangrado para hasta 32 meses en comparación con los perros con hemofilia A no
tratados (n=3) o los perros tratados con vector solo (n=3). La validación de la corrección fenotípica de los perros con
hemofilia A > de dos años mediante terapia combinada de fármaco aprobado por la FDA (bortezomib) y el vector de
AAV que porta transgenes de tamaño mayor facilita una expansión significativa de objetivos terapéuticos en la terapia
génica humana.

35 Dosis *in vivo* de inhibidor del proteosoma bortezomib.

El objetivo principal de estos estudios fue validar en animales pequeños y grandes la "terapia de combinación" usando
bortezomib fármaco aprobado por la FDA y los vectores transgénicos de AAV. Los presentes estudios describen el uso
40 del inhibidor del proteasoma, bortezomib (además conocido como Velcade®), ya que éste es el único inhibidor del
proteasoma actualmente aprobado para uso clínico por la FDA. El bortezomib, igual que la mayoría de las
quimioterapia, se dosifica basado en el área de la superficie corporal. Para todos los estudios con animales grandes, se
usó la dosis aprobada por la FDA de (1,3 mg/m²). Sin embargo, los datos de toxicidad preclínica han establecido una
dosis segura de bortezomib para ratones de 0,5 mg por kilogramo de peso corporal²³. Se estableció que los ratones que
45 le administraron la dosis de 0,5 mg/kg sin el vector de AAV toleraron los inhibidores del proteasoma sin efecto
secundario aparente o cambio en los parámetros hematológicos. Se probaron ratones adicionales con dosis superiores
(1,0 mg/kg de bortezomib), pero ocasionalmente los ratones que recibieron esta dosis mostraron disminución de la
actividad y alimentación. Por lo tanto, basándose en estudios y análisis previos de toxicidad preclínica, se administró el
inhibidor del proteasoma bortezomib a 0,5 mg/kg mediante una única inyección de la vena porta coadministrada con los
50 vectores de AAV en todos los estudios con ratón. Aunque la dosificación en los ratones se calculó sobre una base de
peso corporal por kilogramo frente al área de superficie corporal recomendada clínicamente, la dosis total usada en
ratones es más o menos equivalente a la dosis total usada en los estudios con perros descritos en la presente
descripción.

55 Vectores de AAV y fármacos adicionales:

El vector de expresión de factor VIII usado en estos estudios se ha descrito previamente⁶. El vector contiene un ADNc
de FVIII (cFVIII) con el dominio B canino (BDD) delecionado conducido por un promotor/potenciador corto específico al
hígado derivado sintéticamente, seguido por un intrón quimérico (IGBP/pot/intrón). El vector de factor IX se ha descrito
60 previamente y contiene un casete de expresión de 4,2 kb que incluye el ADNc hFIX (1,4 kb) bajo control transcripcional
de potenciador de CMV/promotor β-actina de pollo (rAAV-CBA-hFIX)²². Todos los vectores se produjeron y titularon en
el UNC Virus Vector Core Facility como se describió previamente³⁹, incluyendo una proteína de fluorescencia verde
(GFP) que codifica el AAV2 monocatenario y autocomplementario, conducido por el promotor de CMV (tamaño total de
aproximadamente 1,5 kb); luciferasa de luciérnaga encapsidada con la cápsida de AAV8; conducida por el promotor
65 CBA; y AAV2 y AAV8 que expresan el factor IX humano (hFIX). El bortezomib (Millennium Pharmaceutical Co.,

Cambridge, MA) se diluyó en solución salina tamponada con fosfato (PBS) para la inyección. MG132 (CalBioChem, La Jolla, CA) se disolvió con etanol al 70% hasta 20 mM como solución concentrada. Se adquirió dexametasona como solución inyectable de Sicoor Pharmaceuticals Inc, Irvine, CA.

5 Cultivo celular y análisis FACScan

Se cultivaron células 293T en medio Eagle modificado por Dulbecco (Mediatech, Herndon, VA) suplementado con suero bovino fetal al 9% y solución de penicilina/estreptomicina al 1% y se transdujo a una multiplicidad de infección de 1. A los 3-5 días después de la transducción, se cosecharon las células, se fijaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía formaldehído al 2%/glutaraldehído al 0,2%, y se analizaron mediante FACScan como se describió previamente⁴⁰.

Cuidado y Estudios de Animales:Ratones

15 Los ratones deficientes en FVIII (FVIII^{-/-}) tienen una delección dirigida del exón 16 del gen FVIII. Los ratones C57Bl/6 FIX^{-/-} tienen una delección dirigida del promotor a través del 3^{er} exón del gen FIX. Los ratones FVIII^{-/-} y FIX^{-/-} se criaron en casa. Se obtuvieron ratones C57B6 silvestres del Laboratorio Jackson (Bar Harbor, ME) para el suministro a las 7-8 semanas de edad del vector luciferasa. Se anestesiaron los ratones hemofílicos usando Avertin al 2,5% para todos los procedimientos. Todas las muestras de plasma se recogieron del plexo retroorbital en citrato de sodio al 3,2% y se almacenaron a -80°C. La recogida de sangre retroorbital y las imágenes de bioluminiscencia se realizaron bajo anestesia con isoflurano.

25 Los ratones FIX^{-/-} recibieron inyección en la vena porta de 3×10^{10} gc/animal de vector de AAV2.hFIX o AAV8.hFIX en un volumen total de 200 µl con o sin una dosis única de bortezomib (0,5 mg/kg) al tiempo de suministro de AAV. Los ratones FVIII^{-/-} KO recibieron inyección venosa portal de 3×10^{10} gc/ratón de AAV2. CFVIII o AAV8. CFVIII, junto con bortezomib o MG132 (0,5 mg/kg de peso corporal), así como una dosis única de 1 mg/kg de factor VIIa recombinante humano (NovoSeven, Novo Nordisk, Dinamarca) para soportar la hemostasia perioperatoria. Para evitar la respuesta inmune mediada por anticuerpos al transgén FVIII canino, todos los ratones FVIII^{-/-} recibieron ciclofosfamida (Sigma Aldrich, St Louis, MO) inyectada por vía intraperitoneal en 3 dosis de 100 µg cada uno en los días -3, 0, y +3, como se describió previamente⁶.

35 Los ratones C57B6 recibieron 10¹¹ genomas de vector/AAV8 de ratón que expresaban luciferasa de luciérnaga bajo el control transcripcional del potenciador de CMV/promotor de β-actina de pollo a través de la vena de la cola; los grupos que recibieron terapia con dexametasona se trataron con 0,2 mg/animal por vía intraperitoneal 1-2 horas antes del suministro de AAV.

Cuidado y estudios de animales:Perros con Hemofilia A

40 Los perros con hemofilia A fueron perros de raza mixta a partir de la colonia con hemofilia A inicialmente alojados en el Centro de Investigación Scott-Ritchey de la Universidad de Auburn, pero ahora en la Facultad de Medicina UAB. Todos los animales se alojaron en instalaciones que se acreditan por AAALAC. Los perros tratados fueron machos (n=4) o hembras (n=3) con hemofilia A severa. Se administraron AAV8. CFVIII a todos los 7 perros mediante administración de la vena mesentérica 3-4 semanas después del nacimiento⁴¹. Cuatro perros (2 hembras/2 machos) se les administraron además bortezomib (1,3 mg/m²) en el momento de la administración del vector. Un perro macho y uno hembra se administraron IV con dexametasona (1,0 mg/kg) en el momento de la administración del vector y bortezomib.

Ensayos de actividad del factor VIII y factor IX de coagulación y ensayo de anticuerpos inhibidores Bethesda de factor VIII canino en ratones

50 La actividad de FVIII canino en plasma de ratón se midió mediante el kit de ensayo de actividad cromogénica SP4 (Chromogenix, DiPharma, West Chester, OH) siguiendo la instrucción del fabricante con modificación. El plasma canino normal (considerado como 100 por ciento de actividad = 1 UI/ml) se diluyó en serie en plasma de ratón combinado con FVIII^{-/-} para generar la curva estándar. Los anticuerpos neutralizantes al FVIII canino en ratón se midieron mediante el ensayo Bethesda usando un Analizador de Coagulación START 4 como se describió⁴² (Diagnostica Stago, Asnières, Francia). El factor IX humano se midió basándose en un ensayo de actividad de factor IX en una etapa (aPTT específico a FIX) como se describió previamente, usando un Analizador de Coagulación START 4 (Diagnostica Stago, Asnières, Francia)⁴³.

Actividad de FVIII, de coagulación y ensayos Bethesda en perros

60 Se obtuvieron muestras de sangre de perros controles normales, controles de FVIII sin tratar y con hemofilia A tratados como se describió⁴⁴. El tiempo de coagulación de la sangre total (WBCT) y el título Bethesda se midieron como se describió previamente. El ensayo WBCT se terminó a los 20 minutos si no se había formado un coágulo.

65 Preparación de extracto nuclear y citoplásmico de células hepáticas

Las fracciones nucleares y citoplasmáticas se aislaron como se describió⁴⁵ con ligera modificación. Los hígados de ratón se perfundieron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se picaron en hielo y se homogenizaron (tampón: 250mM de sacarosa, 50mM de Tris-HCl (pH 7.5), 25mM de KCl, 5mM de MgCl₂, NP-40 al 0,5%, 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF)), usando un homogenizador Dounce. Los núcleos y otros orgánulos se recogieron mediante centrifugación durante 10 min a 3.000 rpm en una centrifuga clínica Sorvall. El sobrenadante se filtró usando un filtro de tamaño de poro de 40 µm y se usó como el citoplasma. El precipitado multicapa se procesó adicionalmente en un extracto nuclear disuelto en agua destilada.

10 Imágenes *in vivo* de bioluminiscencia

Una semana después de la inyección del vector de AAV8. Luciferasa, los ratones se inyectaron intraperitonealmente con 150 µg/g de D-luciferina (Biotium, Hayward, CA) en PBS. La imagen de bioluminiscencia con una cámara CCD (IVIS, Xenogen) se inició exactamente 15 minutos después de la inyección. Las intensidades de la señal de las imágenes del cuerpo completo vivo se expresan como flujo total de fotón (fotones/s/cm²).

PCR cuantitativo (Q-PCR) del factor VIII canino y de los transgenes de luciferasa de luciérnaga

Se realizó Q-PCR para ADN de cFVIII en ADN genómico aislado de hígado de ratón ¹¹ usando el kit iQ SYBR Green de Bio-Rad (Hercules, CA) a las dos semanas después del suministro del vector de factor VIII. Se cuantificó el número de copias del ADN de cFVIII frente a los estándares generados con plásmido linealizado que codifica el ADN de BDD FVIII canino diluido en serie en los ADN genómicos mezclados de ratones C57 vigenes, de 1×10^7 a 1 copia/reacción y normalizado para β-actina de ratón. Las secuencias de iniciadores usadas para FVIII canino fueron idénticas a las descritas previamente^{11,17}. Q-PCR para el ADN de luciferasa se realizó una semana después del suministro del vector de luciferasa., A continuación de las imágenes de luminiscencia, se sacrificaron los ratones y se extrajo ADN genómico del hígado, cerebro, corazón, pulmón, bazo, estómago, riñón, íleon, músculo y testículo. La Q-PCR de la luciferasa y beta actina se realizó en los ADN genómicos aislados usando el kit iQ SYBR Green de Bio-Rad (Hercules, CA). Se cuantificaron y normalizaron los números de copias de los productos génicos de la luciferasa y FVIII canino para la β-actina de ratón y se expresaron como copias del vector por célula. Todas las reacciones de Q-PCR se realizaron en iCycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

Efecto inhibitor del proteasoma en los serotipos de AAV que portan un casete de expresión de factor IX de tamaño silvestre en ratones con hemofilia B.

Se condujeron estudios para probar el efecto de la terapia de combinación usando bortezomib en la corrección *in vivo* de animales hemofílicos. En primer lugar, se usó un vector que porta un genoma aproximadamente del mismo tamaño que el AAV silvestre para la corrección de la hemofilia B en un modelo de ratón. Se infundieron vectores de AAV que portan un casete de expresión de factor IX humano conducido por el potenciador de CMV/promotor de β-actina de pollo, descrito previamente²², a través de la vena porta a ratones con hemofilia B con o sin una dosis única de bortezomib en el momento del suministro del vector . Como se muestra en la Figura 2A, los ratones tratados con ssAAV2.FIX promediaron un 2,4% de actividad del factor IX durante las 20 semanas de observación. El tratamiento con bortezomib resultó en una expresión promedio de 4,3% de factor IX durante el mismo período, equivalente a un aumento del 83% en el factor IX expresado. La expresión del factor IX dirigida al hígado fue más eficiente usando AAV8 que AAV2, y los ratones que recibieron el vector solo expresaron un promedio del 40% de la actividad del factor IX durante las 20 semanas. La expresión del factor IX durante 20 semanas se aumentó modestamente en ratones que recibieron la dosis única de bortezomib coadministrada con el vector de AAV8, promediando ~24% de la actividad del factor IX más elevada (Figura 2B).

Efecto inhibitor del proteasoma en los serotipos de AAV que portan el casete de expresión cFVIII de tamaño mayor que el silvestre en ratones con hemofilia A

Se llevaron a cabo estudios para analizar el efecto de la terapia de combinación usando el casete transgénico grande FVIII en ratones hemofílicos A usando el mismo fondo genético (C57B1/6). El ADNc del Factor VIII (~7,1 kb) contiene un dominio B grande (~2,7 kb) que no contribuye a la coagulación de la sangre; una vez que se eliminan la mayoría de las secuencias que codifican para el dominio B, la secuencia de ADNc de cFVIII de 4,5 kb puede incorporarse en vectores de AAV. Sin embargo, después de la adición del promotor y otros elementos reguladores de la transcripción requeridos, estos vectores producen un casete de expresión de AAV de tamaño sobredimensionado de 5,6 kb. Se generaron los vectores de AAV2 y AAV8 usando el plásmido de expresión FVIII de 5,6 kb. El virus se caracterizó por el número de partículas totales por qPCR, la integridad del virión por microscopía electrónica, la relación de cápsida por tinción de plata y el tamaño del genoma de ADN por electroforesis alcalina en gel. Todos los parámetros del vector fueron consistentes con estudios previos entre múltiples corridas de producción tanto para estudios en ratón como canino. Para los estudios de FVIII, se eligieron los inhibidores de proteosoma MG-132 (además denominados Z-LLL) y bortezomib de manera que el MG-132 pudiera compararse con el agente bortezomib, aprobado clínicamente pero no probado.

Tanto el MG-132 como el bortezomib condujeron a una expresión aumentada del transgén de FVIII en comparación con los ratones que recibieron el vector solo (Figura 2C, y 2D). Como se muestra en la Figura 2C, la actividad de FVIII fue indetectable hasta la semana 8 después del vector de AAV2 solo, mientras que el factor VIII fue detectable a la semana 2 en ratones que recibieron coadministración de MG132 y a la semana 1 en ratones que recibieron bortezomib. La expresión se aumentó en promedio >150% por MG132 y >550% de bortezomib.

A diferencia del inicio tardío de la expresión observada en ratones que recibieron el vector de AAV2 sin inhibidor del proteasoma, los ratones que recibieron el vector de AAV8 solo (Figura 2D) tuvieron FVIII canino detectable en el examen más temprano en la primera semana después de la transducción. En estos ratones, el factor VIII canino alcanzó su máximo a las 8 semanas, después comenzó a disminuir. Aunque se observó un ligero aumento de la expresión del factor VIII en el primer mes después de AAV8 con la coadministración de MG-132, la mejora de la expresión del factor VIII no fue tan significativa o persistente como se observó usando bortezomib. La coadministración de bortezomib mejoró la expresión inicial y sostenida del factor VIII canino. En promedio, la expresión de factor VIII fue 259% mayor en los ratones que recibieron la dosis única de bortezomib en comparación con los ratones que recibieron vector de AAV8. CFVIII solo. El análisis de la alanina aminotransferasa (ALT) y la aspartato aminotransferasa (AST) de hígado y los conteos sanguíneos completos no mostraron evidencia de toxicidad hepática o hematológica en cualquiera de los ratones que recibieron vector solo o en combinación con bortezomib. Para facilitar la comparación del efecto inhibitor del proteasoma sobre vectores generados a partir de transgén de factor IX de tamaño wtAAV y transgén de factor VIII sobredimensionado, se grafican los mismos intervalos de tiempo en las Figuras 2A y 2B (factor IX) y en las Figuras 2C y 2D (Factor VIII). El tratamiento con bortezomib se asoció con un aumento proporcionalmente mayor de la expresión transgénica sobredimensionada que el del transgén más pequeño. Este resultado corroboró los estudios *in vitro* que usaron casetes transgénicos idénticos (gen de cloranfenicol acetiltransferasa-CAT) o heterólogos (CFTR)³.

El inhibidor del proteasoma aumenta la acumulación nuclear de los genomas *in vivo*

Se trataron luego ratones con hemofilia A con una terapia de combinación del vector de factor VIII y el inhibidor del proteasoma y se compararon la abundancia de secuencias del vector en el citoplasma y el compartimento nuclear. Dos semanas después de la administración del vector con o sin bortezomib, se purificaron las fracciones citoplásmicas y nucleares de células hepáticas completas de ratones tratados con AAV8.FVIII y se examinaron para determinar la localización de la acumulación intracelular de los genomas del vector. La relación de genomas que persisten en el núcleo en lugar de citoplasma se aumentó con la dosis única de bortezomib, lo que soporta un papel en la influencia de la infección viral. Estos resultados sugieren una vía que puede desviar los genomas del vector sobredimensionado del citoplasma a las estructuras nucleares para etapas posteriores en el no recubrimiento del vector y/o complementación del genoma, como se sugiere por los reportes recientes (Tabla 1).

La dexametasona reduce la dispersión del vector de AAV ectópico para aumentar la transducción hepática proporcional durante la terapia génica hepática

Bortezomib y dexametasona se usan juntos comúnmente en las terapias de oncología clínica. En comparación con la terapia con bortezomib solo, la combinación de dexametasona y bortezomib ha aumentado la eficacia, al igual que la adición de dexametasona en el establecimiento de una respuesta clínica incompleta a la monoterapia con bortezomib.²⁴ Para determinar si este parámetro clínico además es importante para la transducción del vector mejorada de los casetes de transgén sobredimensionados, se evaluó el resultado de la transducción del vector en la terapia de combinación con múltiples fármacos. Se llevaron a cabo estudios previos para examinar algunos agentes farmacológicos adicionales en un esfuerzo por disminuir la absorción de vectores de AAV que expresan el gen reportero en sitios ectópicos durante la terapia génica dirigida al hígado. Durante estos primeros estudios, se observó una tendencia a disminuir la dispersión del vector ectópico cuando la dexametasona se administró conjuntamente con el vector. Esto se reflejó en la menor expresión génica y persistencia del genoma en varios órganos, incluyendo corazón, bazo y páncreas con un modesto aumento en el suministro hepático (Figura 3 y Tabla 2). Basándose en el uso clínico de la dexametasona con bortezomib y estos resultados, se llevaron a cabo estudios en los que se trató un grupo adicional de ratones AAV8. CFVIII/bortezomib de manera simultánea con una dosis única de corticosteroide dexametasona y se examinó el efecto sobre la expresión persistente de los transgenes.

Observación a largo plazo del aumento farmacológico de la expresión de AAV. CFVIII en ratones knockout a FVIII

Habiendo establecido el potencial de bortezomib para aumentar la expresión del factor VIII, se trataron ratones adicionales con vectores de AAV2 y AAV8 para determinar la duración del aumento de bortezomib. La actividad del factor VIII circulante en ratones que recibieron AAV2 solo fue detectable por primera vez a las 8 semanas y fluctuó alrededor del límite inferior de detección de este ensayo (~1% de actividad = 0,01 IU/ml) a lo largo de un año de observación (Figura 4) Sin embargo, la coadministración de bortezomib resultó en una actividad detectable del factor VIII en la semana 1 en la mayoría de los ratones, que alcanzó su máximo en la semana 8 (0,11±0,06 UI/ml) y se mantuvo en más del 3% durante un año. La expresión de cFVIII a partir del vector de AAV8 alcanzó su máximo en la semana 8 (0,51±0,38 UI/ml) antes de disminuir gradualmente a una meseta ~ 10% de la actividad normal del factor VIII humano que se mantuvo hasta la semana 52 (observación final, 0,10±0,019 UI/ml). Por el contrario, los ratones tratados con AAV8. CFVIII y la dosis única de bortezomib superaron incluso al primer intervalo de tiempo (semana 1) el valor

máximo del grupo sólo de vectores y mantuvieron la actividad de cFVIII de > 50% normal durante un año de observación (actividad de cFVIII $0,67 \pm 0,58$ UI/ml a la semana 52), como se muestra en la Figura 4. En estos estudios, el patrón general de expresión en ratones tratados con bortezomib fue similar con y sin la adición de dexametasona.

5 Desarrollo de anticuerpos neutralizantes de FVIII caninos en ratones knockout FVIII

Como se muestra en la Tabla 3, algunos ratones en cada uno de los grupos de tratamiento desarrollaron anticuerpos neutralizantes de FVIII en diversos momentos 2-20 semanas después de la exposición del vector, a pesar de la dosificación de ciclofosfamida realizada según el esquema descrito por Sarkar y otros⁶. Los títulos de inhibidor estuvieron cerca de los límites inferiores de detección en los pocos ratones tratados con AAV2. CFVIII que desarrollaron anticuerpos y la importancia de estos títulos limitó no está claro. Como se reportó previamente por Jiang y otros,¹⁶ los inhibidores se desarrollaron más frecuentemente con AAV8. CFVIII que con AAV2. CFVIII, observándose en 6/10 ratones que recibieron AAV8. CFVIII sin inhibidor del proteasoma. La coadministración de bortezomib pareció disminuir la incidencia de formación de inhibidor en animales tratados con serotipo AAV8 (5/15 ratones, 33,3%). La combinación de corticosteroides y bortezomib se asoció con la más baja tasa de formación de inhibidores (20% de AAV8. CFVIII/bortezomib/dexametasona frente a 60% de ratones sólo con vector), lo que sugiere un beneficio potencial de esta terapia de combinación.

20 Mejora fenotípica de los perros con hemofilia A que se les suministra bortezomib de manera simultánea con el vector de AAV

Usando casetes de vector de AAV cFVIII idénticos, se llevaron a cabo estudios para determinar si el aumento del inhibidor del proteasoma de la expresión de transgenes grandes se traduce al modelo canino de hemofilia A. Como se muestra en la Tabla 4, un total de siete perros con hemofilia A se trataron con AAV8. CFVIII con un seguimiento de al menos diez meses (el seguimiento más prolongado = 32 meses). Tres cachorros con hemofilia A recibieron una dosis limitante de 1×10^{13} vg/kg de AAV8. CFVIII (AAV8) a través de la vena porta. Cuatro cachorros con hemofilia A recibieron la misma terapia de AAV y recibieron una única dosis I.V. de inhibidor del proteasoma bortezomib a la dosis aprobada por la FDA de $(1,3 \text{ mg/m}^2)$. El vector y el inhibidor del proteasoma se toleraron bien. Específicamente, no se observaron elevaciones de transaminasas hepáticas, síntomas neurológicos ni cambios en los parámetros hematológicos.

La corrección del potencial de coagulación del plasma se cuantificó usando el Tiempo de Coagulación de la Sangre Total (WBCT). El tiempo para coagular en perros hemostáticamente normales es un WBCT de 6 - 10 minutos; el WBCT en perros con hemofilia A sin tratar es mayor de 20 minutos. Al examinar el efecto potencial de la terapia de combinación lo más pronto posible en el intervalo de tiempo, la media de WBCT a una semana después del suministro de AAV8 solo fue >16 minutos, en comparación con los 8,8 minutos en los perros que recibieron bortezomib + AAV8 (Figura 5 y Tabla 4). Sorprendentemente, el efecto de la dosis única de bortezomib fue evidente durante meses. Al examinar la corrección durante los primeros diez meses a continuación del suministro del vector (cantidad mínima de seguimiento que está disponible para los siete perros), los dos perros machos que recibieron AAV8 solo tuvieron sólo 4 de un total de 40 (10%) mediciones individuales de WBCT en el intervalo normal; los machos que recibieron bortezomib + AAV8 tuvieron 33 de 44 (75%) ensayos WBCT individuales completamente normalizados durante el mismo período de observación. La transducción del hígado usando los vectores de terapia génica AAV2 y AAV8 se ha reportado previamente que es menos eficiente en las hembras que en machos 11,29. Las perras que recibieron bortezomib + AAV8 tuvieron 12 de 40 (30%) mediciones de WBCT individuales corregidas en el intervalo normal durante diez meses de seguimiento; una hembra que recibe el vector sin PI tuvo sólo 1 de 20 (5%) de los valores de WBCT en el intervalo normal.

Es importante destacar que el aumento del potencial de coagulación plasmática de la terapia combinada se tradujo directamente en la corrección del fenotipo hemorrágico (Tabla 4). Esta cepa de perros con hemofilia A típicamente experimenta hemorragias aproximadamente 6 veces al año. Tres perros hemofílicos de la misma colonia, no tratados, de igual edad, sangraron 10, 10 y 13 veces cada uno durante 22 meses de observación simultáneo con este estudio, resultando en una tasa mensual de sangrado de $0,50 \pm 0,08$ hemorragias/mes. Los perros que recibieron el vector de AAV8.FVIII solo tuvieron una frecuencia de hemorragia media de $0,80 \pm 0,26$ hemorragias/mes, no significativamente diferente de los perros hemofílicos no tratados ($P = 0,23$). Los perros que recibieron bortezomib con vector tuvieron una media de $0,07 \pm 0,08$ hemorragias/mes, lo que fue una mejora sorprendente en comparación con los perros hemofílicos pareados no tratados ($P < 0,0001$) y los perros tratados sólo con vector ($P < 0,003$). El grupo de tratamiento original ($n=4$) actualmente se ha seguido durante más de 32 meses. Los perros con Bortezomib + vector han tenido 1 y 2 hemorragias espontáneas, respectivamente. Durante el mismo período, los perros sólo con vector tuvieron 12 y 16 hemorragias antes de experimentar cada uno una hemorragia fatal a los 16 y 25 meses después del tratamiento con el vector, respectivamente.

La corrección de la hemofilia A a través de la terapia génica sigue siendo un objetivo de la medicina moderna. Las estrategias que usan vectores de AAV son atractivas, pero el suministro de ADNC de factor VIII ha sido hasta ahora limitada ya que excede la capacidad de empaque de AAV silvestre. Se ha demostrado que los vectores de AAV que portan casetes transgénicos sobredimensionados transducen las células de manera menos eficiente. Esta ineficiencia

puede superarse significativamente mediante el uso de agentes farmacológicos tales como los inhibidores del proteasoma³. Estos estudios indican que la administración simultánea de inhibidor del proteasoma aprobado por la FDA bortezomib con el vector de AAV puede mejorar la corrección persistente de enfermedades que requieren la expresión de un transgén grande.

5

Estos estudios además demuestran que la expresión de un ADNc de factor VIII sobredimensionado suministrado por AAV puede aumentarse varias veces en ratones y perros hemofílicos. La expresión mejorada se demostró usando dos vectores de AAV de serotipos diferentes. El efecto persistió *in vivo* sin tratamiento adicional con proteasoma (> 1 año en ratones hemofílicos y > 2 y ½ años en perros hemofílicos). Más importante aún, en los perros con hemofilia A la terapia de inhibidor del proteasoma de dosis única aumentó con seguridad una dosis del vector de AAV limitante, que no fue capaz de corregir el fenotipo de la enfermedad en ausencia de fármaco. Como resultado, sólo los perros que recibieron bortezomib "terapia de combinación" demostraron protección persistente de las complicaciones crónicas recurrentes y hemorragias letales de la deficiencia grave de factor VIII.

10

15

En estudios destinados a caracterizar vectores de AAV que tienen ya sea una cadena monocatenaria convencional (ssAAV) o una estructura de genoma auto complementaria (scAAV), se observó un aumento en el porcentaje de células que expresan transgenes después de la transducción de AAV2.GFP y coadministración de bortezomib (Figura 1). La cantidad de fluorescencia *in vitro*, de la población de células transducidas satisfactoriamente se aumentó en un grado aún mayor (a partir de un índice de fluorescencia medio de 75 a 890). El aumento de la expresión de bortezomib de un vector autocomplementario fue casi idéntico a la vista con ssAAV lo que sugiere una vía común independientemente de la conformación del molde de vector.

20

Ejemplo 2. Estudios adicionales con vectores de AAV

25

Los ratones con Factor VIII^{-/-} recibieron 3×10^{10} vg/animal de un vector de AAV monocatenario serotipo 8 que codifica un transgén de factor VIII sobredimensionado (n=5 ratones por grupo de tratamiento). La secuencia de ADNc de factor VIII canino incorporada en el vector se diseñó para el uso óptimo de codones de mamífero y el contenido de nucleótidos de GC. Los ratones recibieron infusión del vector en la vena porta sola o en combinación con 0,5 mg/kg de inhibidor del proteasoma bortezomib (PI). Aunque se ha establecido que la optimización de codones aumenta la expresión a partir de los vectores de factor de coagulación VIII y IX, no se estableció si PI podría aumentar aún más los vectores optimizados con codones más eficaces. La expresión aumentada del factor VIII optimizado con codón a continuación de la administración única de bortezomib (Figura 6, línea superior), persistió durante toda la duración del estudio (12 semanas).

30

35

Ratones hemofílicos FVIII^{-/-} que recibieron tratamiento de la articulación de la rodilla posterior con salina normal (NS) con o sin inhibidor del proteasoma bortezomib (PI) 0,5 mg/kg i.v. no se protegieron del desarrollo de sinovitis destructiva cuando se sometieron a una lesión de la rodilla posterior (puntuación de sinovitis >5). Los ratones que recibieron tratamiento con el serotipo 5 de AAV que codifica un vector de Factor VIII transgénico sobredimensionado y posteriormente lesionados se protegieron parcialmente de cambios patológicos (puntuación de sinovitis $3,89 \pm 0,86$), pero la coadministración de PI con el AAV5.FVIII resultó en la mayor protección de la lesión posterior (puntuación de sinovitis $2,77 \pm 0,45$) (Figura 7). Además, cuando el fluido sinovial se lava de las articulaciones de los ratones que reciben AAV5.FVIII, la actividad del factor VIII no puede detectarse dentro de los niveles de sensibilidad del ensayo de actividad de factor VIII en una etapa (<1% de factor VIII). Sin embargo, el líquido sinovial de ratones tratados con PI en el momento del suministro de AAV5.FVIII tiene una actividad medible de factor VIII (actividad 1,1-2,3%).

40

Lo anterior es ilustrativo de la presente invención, y no debe interpretarse como limitante de esta. La invención se define mediante las siguientes reivindicaciones, donde se incluyen los equivalentes de las reivindicaciones.

45

Referencias

1. Allocca, M., y otros Serotype-dependent packaging of large genes in adeno-associated viral vectors results in effective gene delivery in mice. *J Clin Invest* 118, 1955-1964 (2008).
- 5 2. Dong, J.Y., Fan, P.D. & Frizzell, R.A. Quantitative analysis of the packaging capacity of recombinant adeno-associated virus. *Hum Gene Ther* 7, 2101-2112 (1996).
3. Grieger, J.C. & Samulski, R.J. Packaging capacity of adeno-associated virus serotypes: impact of larger genomes on infectivity and postentry steps. *J Virol* 79, 9933-9944 (2005).
- 10 4. Hermonat, P.L., Quirk, J.G., Bishop, B.M. & Han, L. The packaging capacity of adeno-associated virus (AAV) and the potential for wild-type-plus AAV gene therapy vectors. *FEBS Lett* 407, 78-84 (1997).
5. Lu, H., y otros, Complete correction of hemophilia A with adeno-associated viral vectors containing a full-size expression cassette. *Hum Gene Ther* 19, 648-654 (2008).
6. Sarkar, R., y otros Total correction of hemophilia A mice with canine FVIII using an AAV 8 serotype. *Blood* 103, 1253-1260 (2004).
- 15 7. Chao, H., Sun, L., Bruce, A., Xiao, X. & Walsh, C.E. Expression of human factor VIII by splicing between dimerized AAV vectors. *Mol Ther* 5, 716-722 (2002).
8. Chen, L., y otros. The enhancing effects of the light chain on heavy chain secretion in split delivery of factor VIII gene. *Mol Ther* 15, 1856-1862 (2007).
9. Zhang, L., y otros. Efficient expression of CFTR function with adeno-associated virus vectors that carry shortened CFTR genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 10158-10163 (1998).
- 20 10. Wang, B., Li, J. & Xiao, X. Adeno-associated virus vector carrying human minidystrophin genes effectively ameliorates muscular dystrophy in mdx mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13714-13719 (2000).
11. Wu, Z., y otros. Optimization of self-complementary AAV vectors for liver-directed expression results in sustained correction of hemophilia B at low vector dose. *Mol Ther* 16, 280-289 (2008).
- 25 12. Douar, A.M., Poulard, K., Stockholm, D. & Danos, O. Intracellular trafficking of adeno-associated virus vectors: routing to the late endosomal compartment and proteasome degradation. *J Virol* 75, 1824-1833 (2001).
13. Duan, D., Yue, Y., Yan, Z., Yang, J. & Engelhardt, J.F. Endosomal processing limits gene transfer to polarized airway epithelia by adeno-associated virus. *J Clin Invest* 105, 1573-1587 (2000).
14. Landowski, T.H., Megli, C.J., Nullmeyer, K.D., Lynch, R.M. & Dorr, R.T. Mitochondrial-mediated dysregulation of Ca²⁺ is a critical determinant of Velcade (PS-341/bortezomib) cytotoxicity in myeloma cell lines. *Cancer Res* 65, 3828-3836 (2005).
- 30 15. Ponder, K.P. Gene therapy for hemophilia. *Curr Opin Hematol* 13, 301-307 (2006).
16. Jiang, H., y otros. Multiyear therapeutic benefit of AAV serotypes 2, 6, and 8 delivering factor VIII to hemophilia A mice and dogs. *Blood* 108, 107-115 (2006).
- 35 17. Sarkar, R., y otros. Long-term efficacy of adeno-associated virus serotypes 8 and 9 in hemophilia a dogs and mice. *Hum Gene Ther* 17, 427-439 (2006).
18. Scallan, C.D., y otros. Sustained phenotypic correction of canine hemophilia A using an adeno-associated viral vector. *Blood* 102, 2031-2037 (2003).
19. Jennings, K., y otros. Proteasome inhibition enhances AAV-mediated transgene expression in human synoviocytes in vitro and in vivo. *Mol Ther* 11, 600-607 (2005).
- 40 20. Johnson, J.S. & Samulski, R.J. Enhancement of adeno-associated virus infection by mobilizing capsids into and out of the nucleolus. *J Virol* 83, 2632-2644 (2009).
21. Nathwani, A.C., y otros. Enhancing transduction of the liver by adeno-associated viral vectors. *Gene Ther* (2008).
22. Jin, D.Y., Zhang, T.P., Gui, T., Stafford, D.W. & Monahan, P.E. Creation of a mouse expressing defective human factor IX. *Blood* 104, 1733-1739 (2004).
- 45 23. LeBlanc, R., y otros. Proteasome inhibitor PS-341 inhibits human myeloma cell growth in vivo and prolongs survival in a murine model. *Cancer Res* 62, 4996-5000 (2002).
24. Jagannath, S., y otros. Bortezomib therapy alone and in combination with dexamethasone for previously untreated symptomatic multiple myeloma. *Br J Haematol* 129, 776-783 (2005).
- 50 25. Sood, R., y otros. Retreatment with bortezomib alone or in combination for patients with multiple myeloma following an initial response to bortezomib. *Am J Hematol* 84, 657-660 (2009).
26. Harousseau, J.L., y otros. Bortezomib plus dexamethasone as induction treatment prior to autologous stem cell transplantation in patients with newly diagnosed multiple myeloma: results of an IFM phase II study. *Haematologica* 91, 1498-1505 (2006).
- 55 27. Sasgary, M., Ahmad, R.U., Schwarz, H.P., Turecek, P.L. & Reipert, B.M. Single cell analysis of factor VIII-specific T cells in hemophilic mice after treatment with human factor VIII. *Thromb Haemost* 87, 266-272 (2002).
28. Wu, H., y otros. Mechanism of the immune response to human factor VIII in murine hemophilia A. *Thromb Haemost* 85, 125-133 (2001).
29. Davidoff, A.M., Ng, C.Y., Zhou, J., Spence, Y. & Nathwani, A.C. Sex significantly influences transduction of murine liver by recombinant adeno-associated viral vectors through an androgen-dependent pathway. *Blood* 102, 480-488 (2003).
- 60 30. Yan, Z., y otros. Ubiquitination of both adeno-associated virus type 2 and 5 capsid proteins affects the transduction efficiency of recombinant vectors. *J Virol* 76, 2043-2053 (2002).
31. Zhong, L., y otros. Tyrosine-phosphorylation of AAV2 vectors and its consequences on viral intracellular trafficking and transgene expression. *Virology* (2008).
- 65

32. Zhong, L., y otros. Next generation of adeno-associated virus 2 vectors: point mutations in tyrosines lead to high-efficiency transduction at lower doses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 7827-7832 (2008).
33. Finn, J.D., y otros. Proteasome inhibitors Decrease AAV2 Capsid derived Peptide Epitope Presentation on MHC Class I Following Transduction. *Mol Ther* (2009).
- 5 34. Muchamuel, T., y otros. A selective inhibitor of the immunoproteasome subunit LMP7 blocks cytokine production and attenuates progression of experimental arthritis. *Nat Med* 15, 781-787 (2009).
35. Blanco, B., y otros. Bortezomib induces selective depletion of alloreactive T lymphocytes and decreases the production of Th1 cytokines. *Blood* 107, 3575-3583 (2006).
- 10 36. Elliott, P.J., Zollner, T.M. & Boehncke, W.H. Proteasome inhibition: a new anti-inflammatory strategy. *J Mol Med* 81, 235-245 (2003).
37. Everly, J.J., Walsh, R.C., Alloway, R.R. & Woodle, E.S. Proteasome inhibition for antibody-mediated rejection. *Curr Opin Organ Transplant* (2009).
38. Khan, S., y otros. Immunoproteasomes largely replace constitutive proteasomes during an antiviral and antibacterial immune response in the liver. *J Immunol* 167, 6859-6868 (2001).
- 15 39. Choi, V.W., Asokan, A., Haberman, R.A. & Samulski, R.J. Production of recombinant adeno-associated viral vectors for in vitro and in vivo use. *Curr Protoc Mol Biol* Chapter 16, Unit 16 25 (2007).
40. Cockrell, A.S., Ma, H., Fu, K., McCown, T.J. & Kafri, T. A trans-lentiviral packaging cell line for high-titer conditional self-inactivating HIV-1 vectors. *Mol Ther* 14, 276-284 (2006).
- 20 41. Mount, J.D., y otros. Sustained phenotypic correction of hemophilia B dogs with a factor IX null mutation by liver-directed gene therapy. *Blood* 99, 2670-2676 (2002).
42. Waters, B., y otros. Anti-CD3 prevents factor VIII inhibitor development in hemophilia A mice by a regulatory CD4+CD25+-dependent mechanism and by shifting cytokine production to favor a Th1 response. *Blood* 113, 193-203 (2009).
- 25 43. Zhang, T.P., y otros. Transgene expression levels and kinetics determine risk of humoral immune response modeled in factor IX knockout and missense mutant mice. *Gene Ther* 14, 429-440 (2007).
44. Herzog, R.W., Mount, J.D., Arruda, V.R., High, K.A. & Lothrop, C.D., Jr. Muscle-directed gene transfer and transient immune suppression result in sustained partial correction of canine hemophilia B caused by a null mutation. *Mol Ther* 4, 192-200 (2001).
- 30 45. Thomas, C.E., Storm, T.A., Huang, Z. & Kay, M.A. Rapid uncoating of vector genomes is the key to efficient liver transduction with pseudotyped adeno-associated virus vectors. *J Virol* 78, 3110-3122 (2004).

Tabla 1. El inhibidor del proteasoma aumenta la acumulación nuclear de los genomas *in vivo*

Tratamiento	citoplasma	Núcleo	Relación N/C
AAV8-cFVIII AAV8 cFVIII+Bortezomib	4,46±0,7 1,2±0,91	5,52±0,96 9,08±2,61	1,3±0,96 7,57±3,62*

Abreviaturas: cFVIII, factor VIII canino; N/C, Nuclear/citoplasma
 Los datos se representaron como la media ± SEM
 * P<0,05

Tabla 2. Efecto de la coadministración de dexametasona para disminuir la expresión transgénica fuera del hígado: luminiscencia mediada por AAV8.Luciferasa y persistencia del genoma del vector

	Animal completo		Hígado		Corazón		Páncreas		Bazo		Testículos	
	Tejido Luminiscente	VG/célula										
Solo Vector (No dex)	1,2±1,4 x108	N/A	5,6±1,3 x106	1	81,5±57,0 x103	0,13	56,2±65,1 x102	1,3	17,6±2,2 x102	0,1	2,3±2,7 x103	<0,0
Vector + Dex 0.2 mg	1,7±1,2 x108	N/A	12,0±0,3 x106	2,5	4,5±1,7 x103	0,09	1,6±0,9 x102	0,05	1,6±0,9 x102	0,05	0,4±0,2 x103	<0,0

* Todos los otros sitios de órganos <1x10⁴ conteos/mg de proteína y <0,1 vg/célula, que incluyen cerebro, pulmón, estómago, íleon, músculo esquelético

La dexametasona 0,2 mg es igual aproximadamente a 8,0 mg/kg como dosis única.

Tabla 3 Desarrollo del inhibidor anti-cFVIII después del tratamiento con AAV2 y AAV8 en ratones FVIII^{-/-}

Animales con Inhibidor/ Totales	Animales	Tiempo de inicio después del vector (semana)	Título del inhibidor (intervalo)
AAV2-cFVIII	1/5	8	0,4-0,5 BIU
AAV2-cFVIII+Bortezomib	2/6	4 y 8	0,4-1,2 BIU
AAV8-cFVIII	6/10	8-20	1,2-10,4 BIU
AAV8-cFVIII+Bortezomib	5/15	2-20	1,0-13,2 BIU
AAV8-cFVIII+Bortezomib+Dex	2/10	6 y 20	0,5-2,4 BIU
<i>Abreviaturas:</i> cFVIII, factor VIII canino; Dex, Dexametasona; BIU, Unidades Bethesda; wk, semana.			

Tabla 4 Resumen de los perros con hemofilia A sometidos a terapia génica mediada por AAV con inhibidores del proteasomas

Perro	Sexo	Tratamiento	Ensayos de Tiempo de Coagulación de Sangre		Frecuencia de sangrado		Estado del inhibidor (BIU)	Resultado
			Total	Valores corregidos con el intervalo normal (% del total de ensayos)	En el año 1 (#)	Total (#/tiempo)		
Cindy	F	AAV8	26	1 (4%)	9	12/18meses	0	Hemorragia Fatal
Mike	M	AAV8	26	4 (15,49%)	9	16/25meses	0	Hemorragia Fatal
Boober	M	AAV8	18	0 (0%)	NA	11/10ms	0	Vivo
Carl	M	AAV8+Bortezomib	34	20 (58,8%)	0	1/32,5ms	0	Vivo
Greg	M	AAV8+Bortezomib +Dexametasona	34	20 (58,8%)	0	2/92,5ms	0	Vivo
Sprocket	F	AAV8+Bortezomib	20	4 (20%)	NA	2/11ms	0	Vivo
Marjonie	F	AAV8+Bortezomib +Dexametasona	20	8 (40%)	NA	0/11ms	0	Vivo
Denver	M	Sin tratamiento				10/22ms	NA	Vivo
Bass	M	Sin tratamiento				13/22ms	NA	Vivo
Gator	M	Sin tratamiento				10/22ms	NA	Vivo

*Edad en la administración del vector = 1 mes. Dosis del vector = 1×10^{13} vg/kg, WBCT, tiempo de coagulación de sangre total; Valor normal de 6-10 minutos para WBCT; WBCT expresado como números en el intervalo normal en las mediciones totales; ms, meses; NA, no aplicable

Tabla 5

	Núm. acceso al GenBank .		Núm. acceso al GenBank .		Núm. acceso al GenBank .
Genomas Completos		Hu T88	AY695375	Clade E	
Virus Adenoasociado 1	NC_002077,AF0634 97	Hu T71	AY695374	Rh38	AY530558
Virus Adenoasociado 2	C_001401	Hu T70	AY695373	Hu66	AY530626
Virus Adenoasociado 3	NC_001729	Hu T40	AY695372	Hu42	AY530605
Virus Adenoasociado 3B	NC_001863	Hu T32	A695371	Hu67	AY530627
Virus Adenoasociado 4	NC_001829	Hu T17	AY695370	Hu40	AY530603
Virus Adenoasociado 5	Y18065, AF085716	Hu LG15	AY695377	Hu41	AY530604
Virus Adenoasociado 6	NC_001862			Hu37	AY530600
AAV aviar ATCC VR-865	A186198, AY629583, NC_004828	Clade C		Rh40	AY530559
Cepa de AAV aviar ADN-1	NC_006263, AY629583	Hu9	AY530629	Rh2	AY243007
AAV Bovino	NC_005889, AY388617	Hu10	AY530576	Bb1	AY243023
		Hu11	AY530577	Bb2	AY243022
Clade A		Hu53	AY530615	Rh10	AY243015
AAV1	NC_002077,AFOB34 97	Hu55	AY530617	Hu17	AY530582
AAV6	NC_001862	Hu54	AY530616	Hu6	AY530621
Hu.48	AY530611	Hu7	AY530628	Rh25	AY530557
Hu 43	AY530606	Hu18	AY530583	Pi2	AY530554
Hu 44	AY530607	Hu15	AY530580	Pi1	AY530553
Hu 46	AY530609	Hu16	AY530581	Pi3	AY530555
		Hu25	AY530591	Rh57	A530569
Clade B		Hu60	AY530622	Rh50	A530563
Hu.19	AY530584	Ch5	AY243021	Rh49	AY530562
Hu.20	AY530586	Hu3	AY530595	Hu39	AY530601
Hu 23	AY530589	Hu1	AY530575	Rh58	AY530570
Hu22	AY530588	Hu4	AY530602	Rh61	AY530572
Hu24	AY530590	Hu2	AY530585	Rh52	AY530565
Hu21	AY530587	Hu61	AY530623	Rh53	AY530566
Hu27	AY530592			Rh51	AY530564

ES 2 628 889 T3

Hu28	AY530593	Clade D		Rh64	AY530574
Hu 29	AY530594	Rh62	AY530573	Rh43	AY530560
Hu63	AY530624	Rh48	AY530561	AAV8	AF513852
Hu64	AY530625	Rh54	AY530567	Rh8	AY242997
Hu13	AY530578	Rh55	AY530568	Rh1	AY530556
Hu56	AY530618	Cy2	AY243020		
Hu57	AY530619	AAV7	AF513851	Clade F	
Hu49	AY530612	Rh35	AY243000	Hu14 (AAV9)	AY530579
Hu58	AY530620	Rh37	AY242998	Hu31	AY530596
Hu34	AY530598	Rh36	AY242999	Hu32	AY530597
Hu35	AY530599	Cy6	AY243016		
AAV2	NC_001401	Cy4	AY243018	Aislado Clonal	
Hu45	AY530608	Cy3	AY243019	AAV5	Y18065, AF085716
Hu47	AY530610	Cy5	AY243017	AAV 3	NC_001729
Hu51	AY530613	Rh13	AY243013	AAV 3B	NC_001863
Hu52	AY530614			AAV4	NC_001829
Hu T41	AY695378			Rh34	AY243001
Hu S17	AY695376			Rh33	AY243002
				Rh32	AY243003

Reivindicaciones

1. Una composición que comprende:
 - a) un vector de virus adenoasociado (AAV) que comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica una proteína seleccionada del grupo que consiste en Factor VIII (FVIII), distrofina, minidistrofina y CFTR en donde el genoma del vector de AAV está sobredimensionado con relación a genoma de AAV silvestre; y
 - b) bortezomib (Velcade®).
2. La composición de la reivindicación 1, en donde el tamaño del genoma del vector de AAV es mayor que aproximadamente 5,2 kb y opcionalmente en donde el vector de AAV comprende un genoma de vector de AAV bicatenario.
3. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en donde el ácido nucleico heterólogo comprende ya sea una secuencia codificante o secuencias no codificantes que se ha optimizado con relación a una secuencia de nucleótidos silvestre.
4. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el genoma del vector de AAV se ha optimizado con relación a un genoma de AAV silvestre.
5. Una formulación farmacéutica que comprende una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y un portador farmacéuticamente aceptable.
6. Un método *in vitro* para suministrar un ácido nucleico que codifica una proteína seleccionada del grupo que consiste en Factor VIII (FVIII), distrofina, minidistrofina y CFTR a una célula, que comprende poner en contacto la célula con:
 - a) un vector de virus adenoasociado (AAV) que comprende el ácido nucleico en donde el genoma del vector de AAV está sobredimensionado en comparación con un genoma de AAV silvestre; y
 - b) bortezomib (Velcade®) o una formulación farmacéutica que comprende (a) y (b) en un portador farmacéuticamente aceptable.
7. El método de la reivindicación 6, en donde la célula es una célula muscular o una célula hepática.
8. El método de la reivindicación 6 ó 7, en donde el vector de AAV se administra antes, después y/o simultáneamente con la administración de bortezomib (Velcade®), en cualquier combinación.
9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, que incluye además una o más de las características de las reivindicaciones 1 a 4.
10. Un kit que comprende:
 - a) un vector de virus adenoasociado (AAV) que comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica una proteína seleccionada del grupo que consiste en Factor VIII (FVIII), distrofina, minidistrofina y CFTR en donde el genoma del vector de AAV está sobredimensionado en comparación con un genoma de AAV silvestre; y
 - b) bortezomib (Velcade®).
11. Un vector de AAV que comprende una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica FVIII; y bortezomib (Velcade®) para usar en el tratamiento de la hemofilia A, en donde el vector de AAV está sobredimensionado en comparación con un genoma de AAV silvestre.
12. El vector de AAV junto con Velcade® para usar de conformidad con la reivindicación 11, en donde la secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica FVIII se ha optimizado con relación a una secuencia silvestre que codifica el FVIII.
13. El vector de AAV junto con Velcade® para usar de conformidad con la reivindicación 11 ó 12, en donde la secuencia nucleotídica heteróloga que codifica FVIII comprende secuencias no codificantes que se han optimizado con relación a secuencias no codificantes silvestres.
14. El vector de AAV junto con Velcade® para usar de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 11-13, en donde el genoma del vector de AAV se ha optimizado con relación a un genoma del vector de AAV silvestre.
15. El vector de AAV junto con Velcade® para usar de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 11-14, en donde el vector de AAV debe administrarse antes, después y/o simultáneamente con la administración del bortezomib (Velcade®), en cualquier combinación.

16. El vector de AAV junto con Velcade® para usar de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 11-14, en donde el vector de AAV debe administrarse antes de la administración del bortezomib (Velcade®).
- 5 17. El vector de AAV junto con Velcade® para usar de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 11-16, en donde el vector de AAV es o AAV de tipo 8 o tipo 2.
- 10 18. Un vector de AAV que comprende una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica distrofina o minidistrofina; y bortezomib (Velcade®) para usar en el tratamiento de la distrofia muscular, en donde el vector de AAV está sobredimensionado en comparación con un genoma de AAV silvestre.
- 15 19. El vector de AAV junto con Velcade® para usar de conformidad con la reivindicación 18 que incluye además una o más de las características enumeradas en las reivindicaciones 11-17 con respecto a la secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica la distrofina o la minidistrofina.
- 20 20. Un vector de AAV que comprende una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica CFTR; y bortezomib (Velcade®) para usar en el tratamiento de la fibrosis quística, en donde el vector de AAV está sobredimensionado en comparación con un genoma de AAV silvestre.
- 20 21. El vector de AAV junto con Velcade® para usar de conformidad con la reivindicación 20 que incluye además una o más de las características enumeradas en las reivindicaciones 11-17 con respecto a la secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica CFTR.

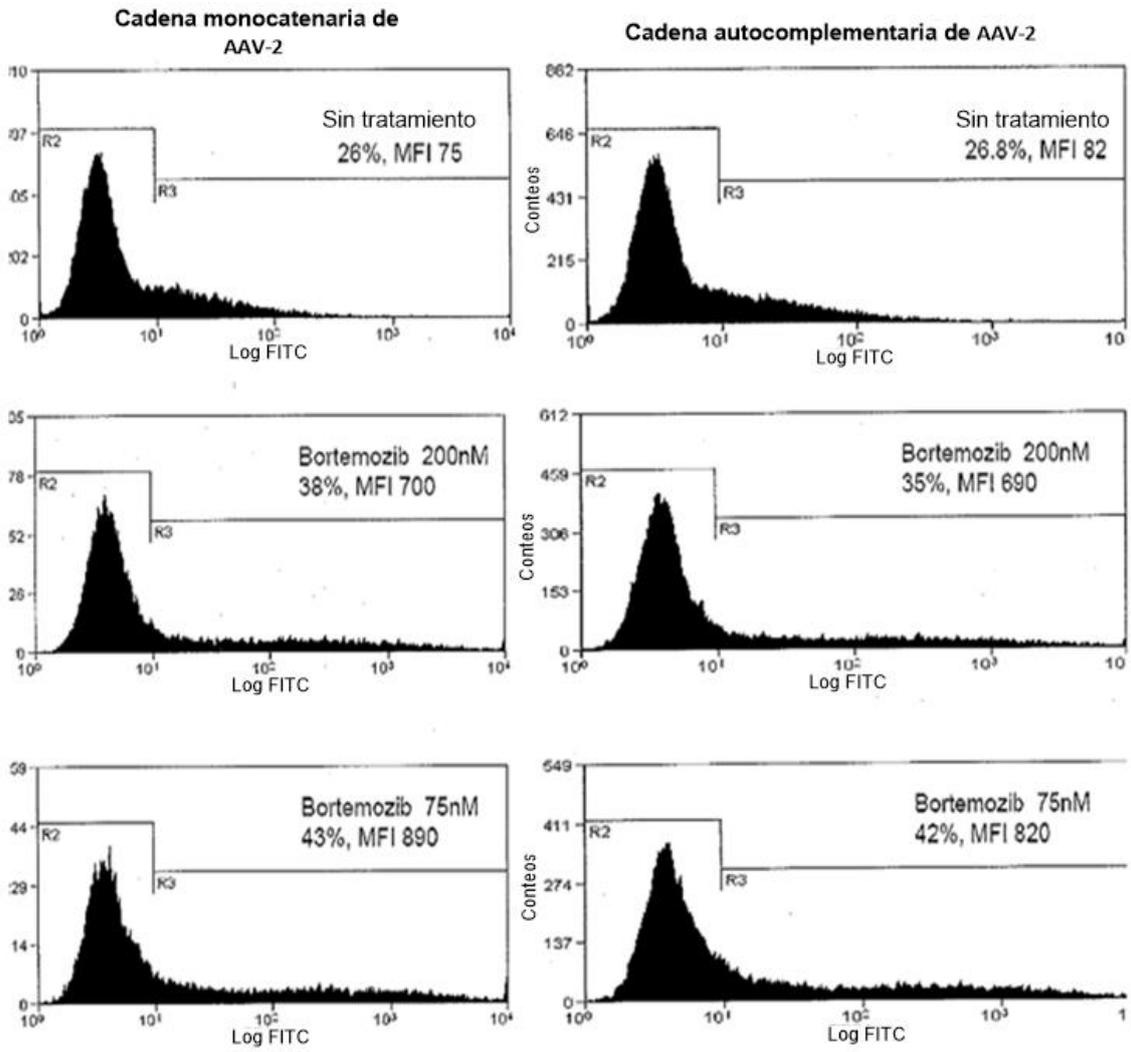


Figura 1

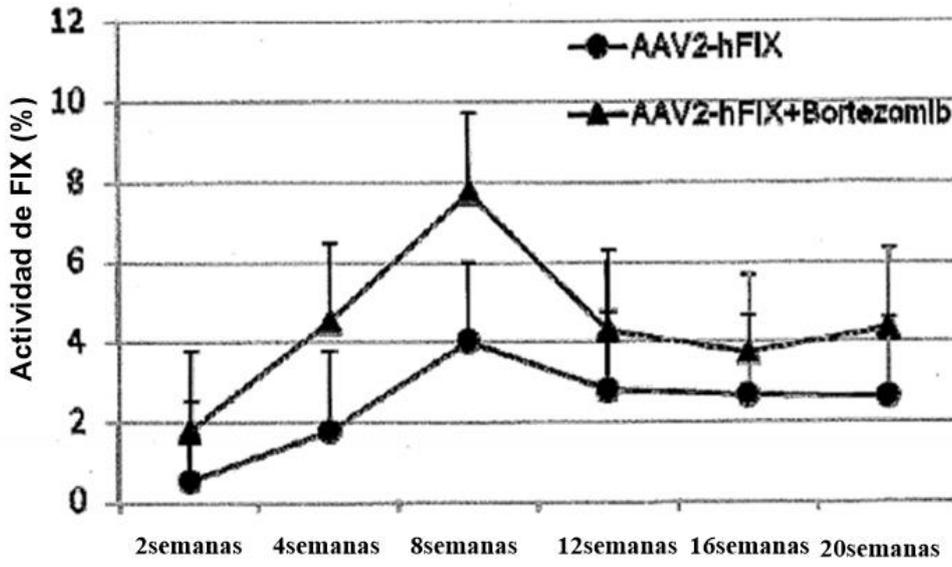


Figura 2A

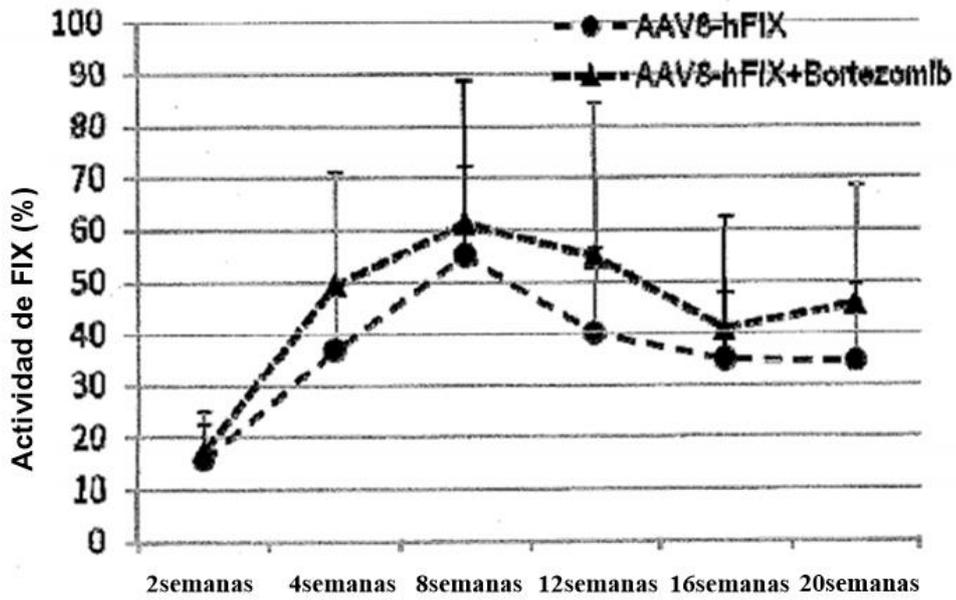


Figura 2B

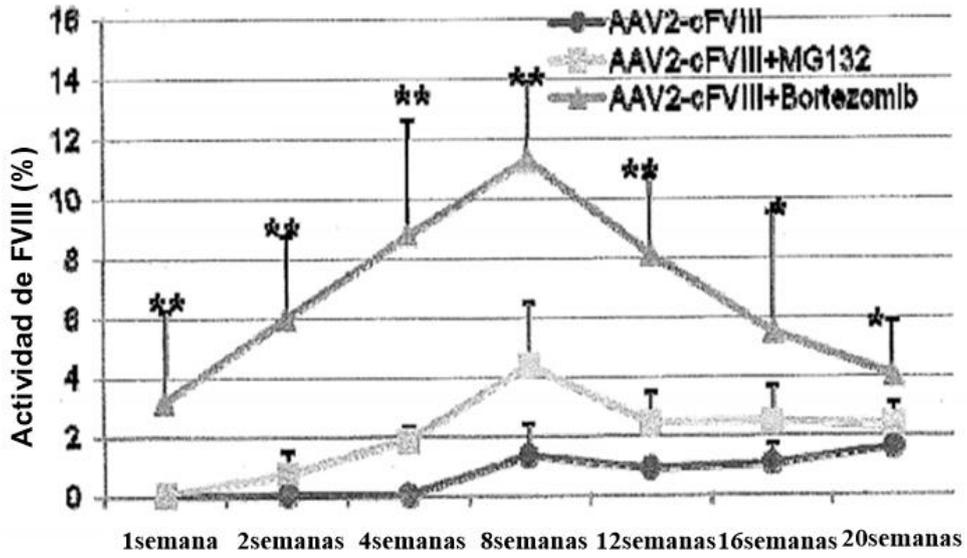


Figura 2C

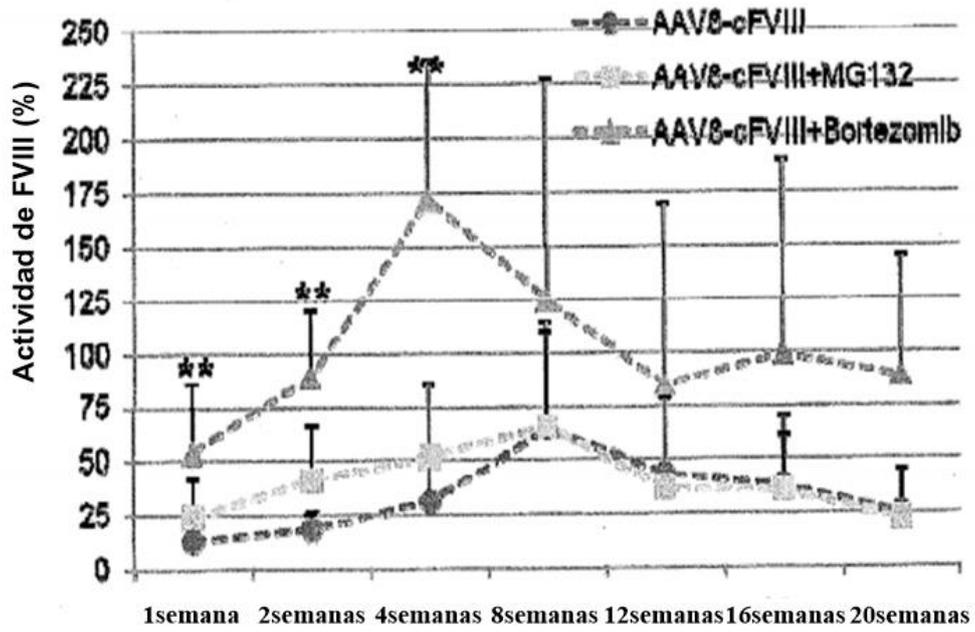
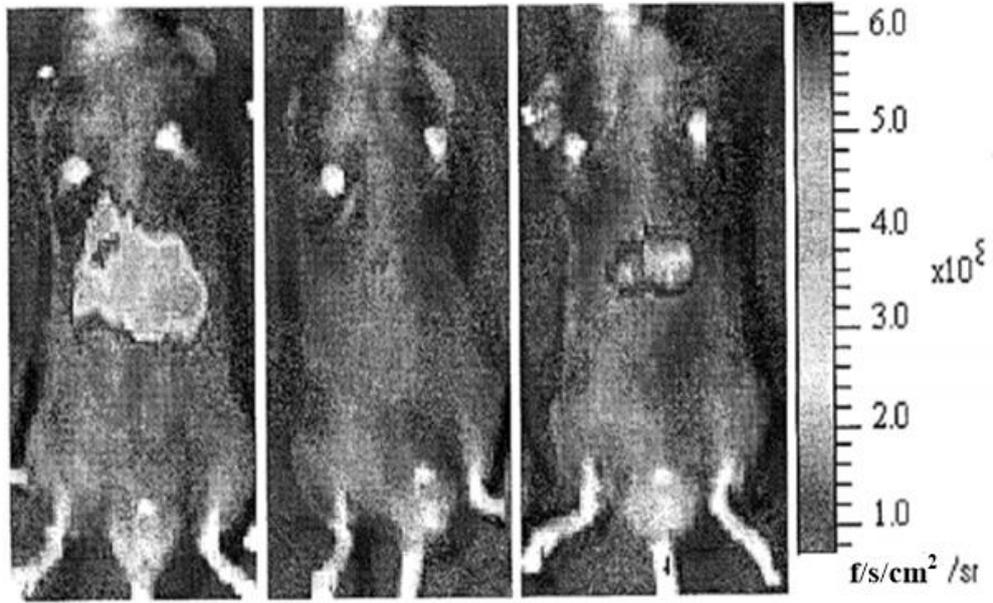


Figura 2D

AAV8 Luciferasa



**AAV8 Luciferasa
+Dexametasona**

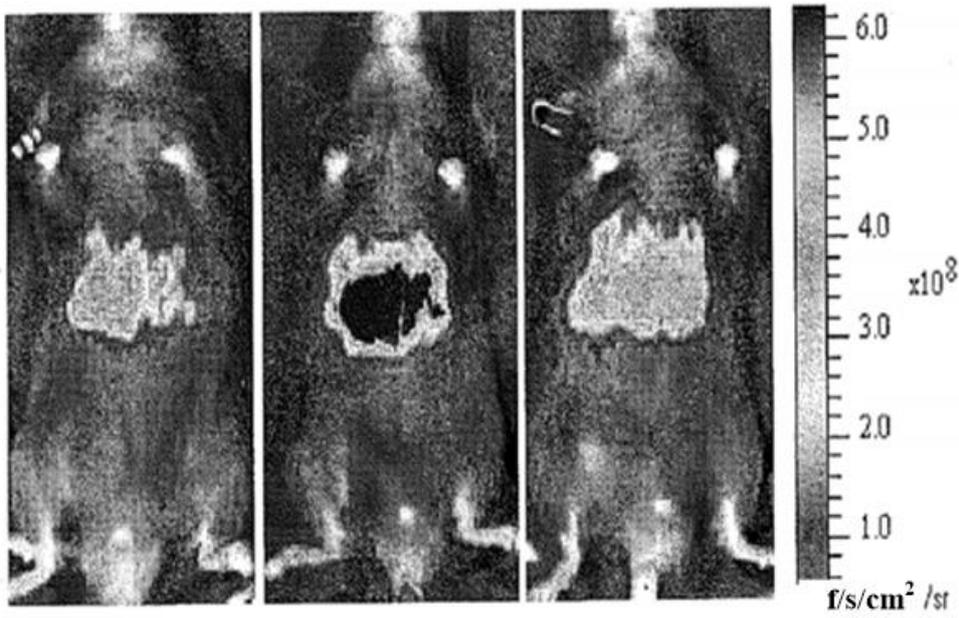


Figura 3

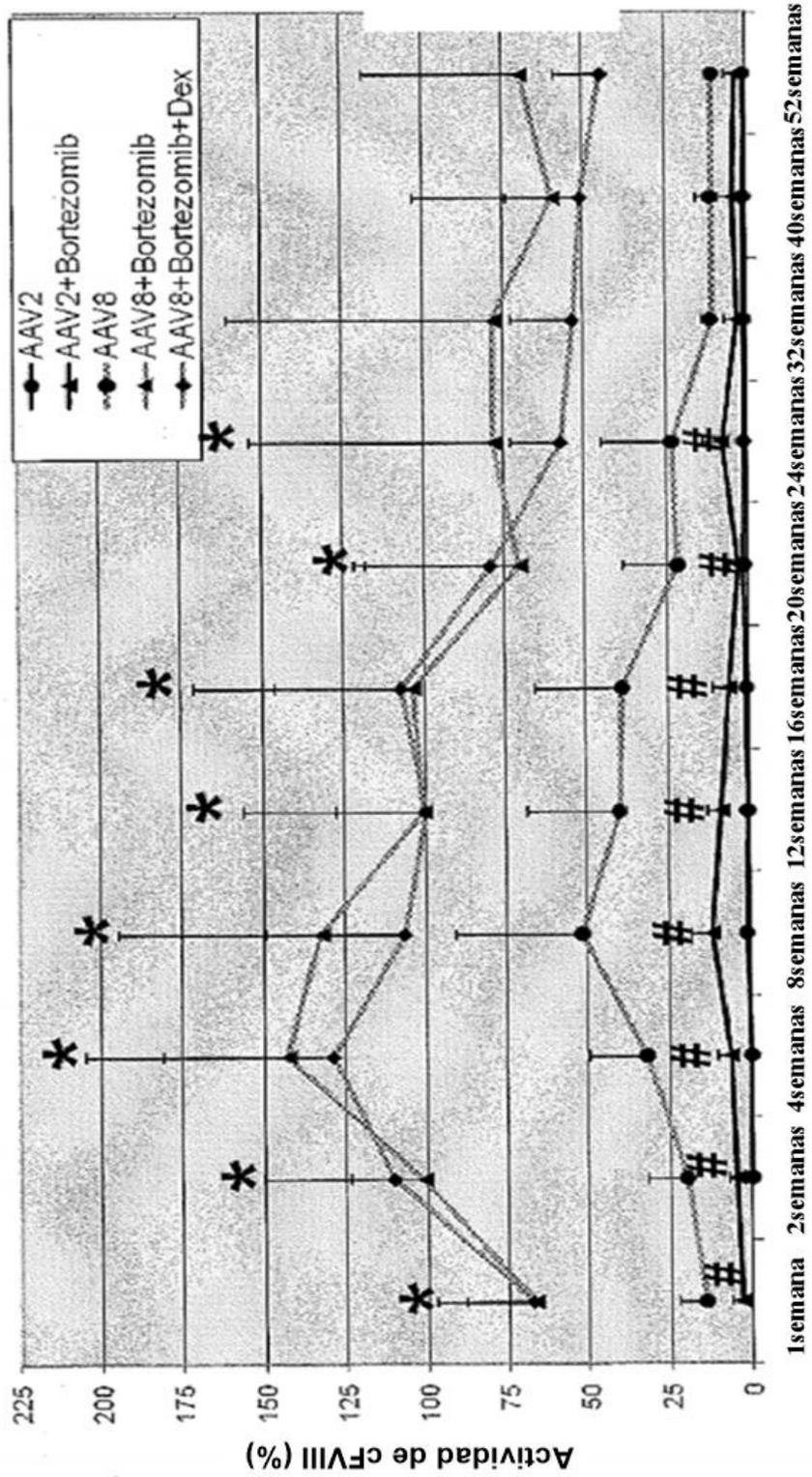


Figura 4

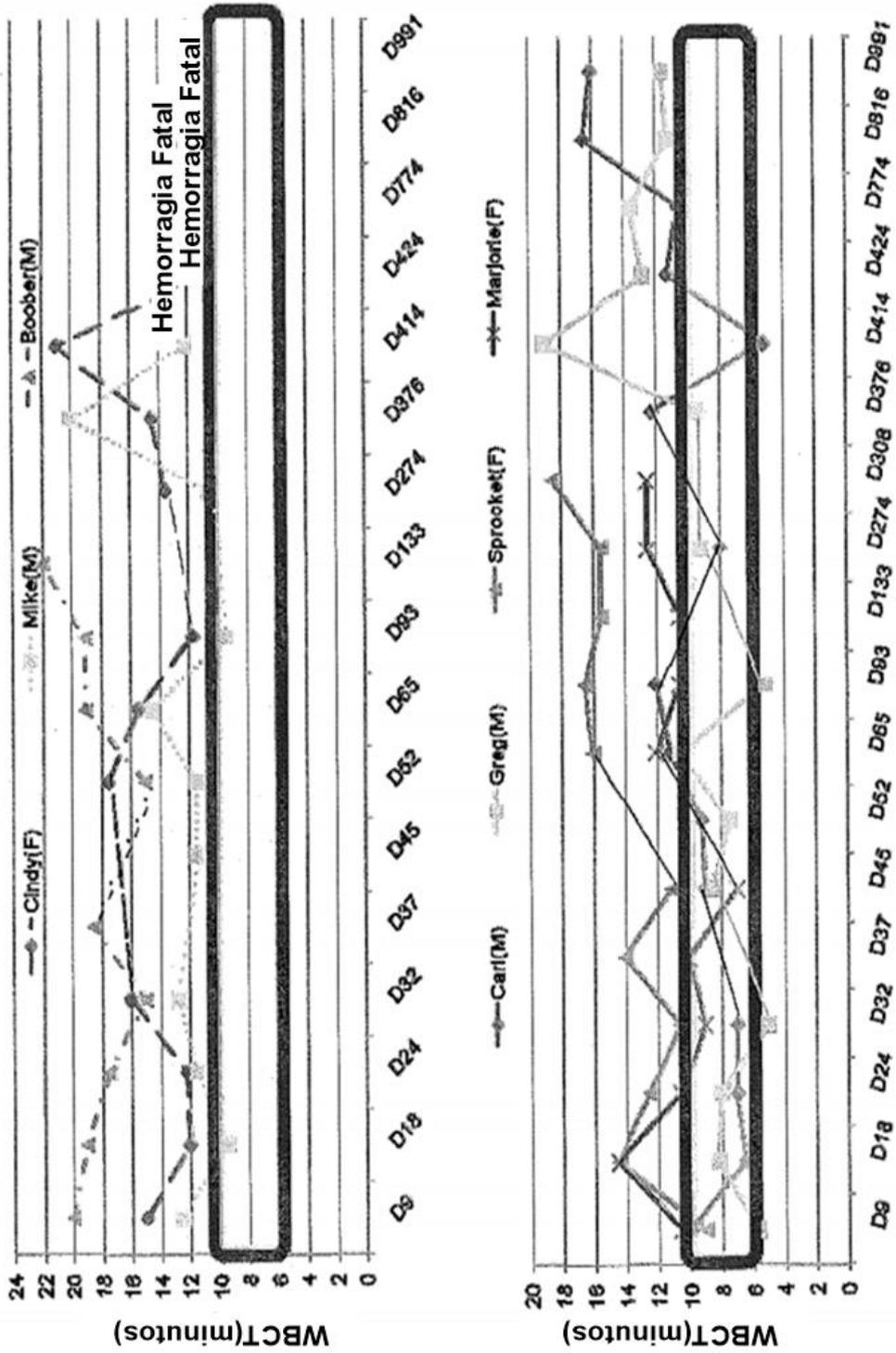


Figura 5

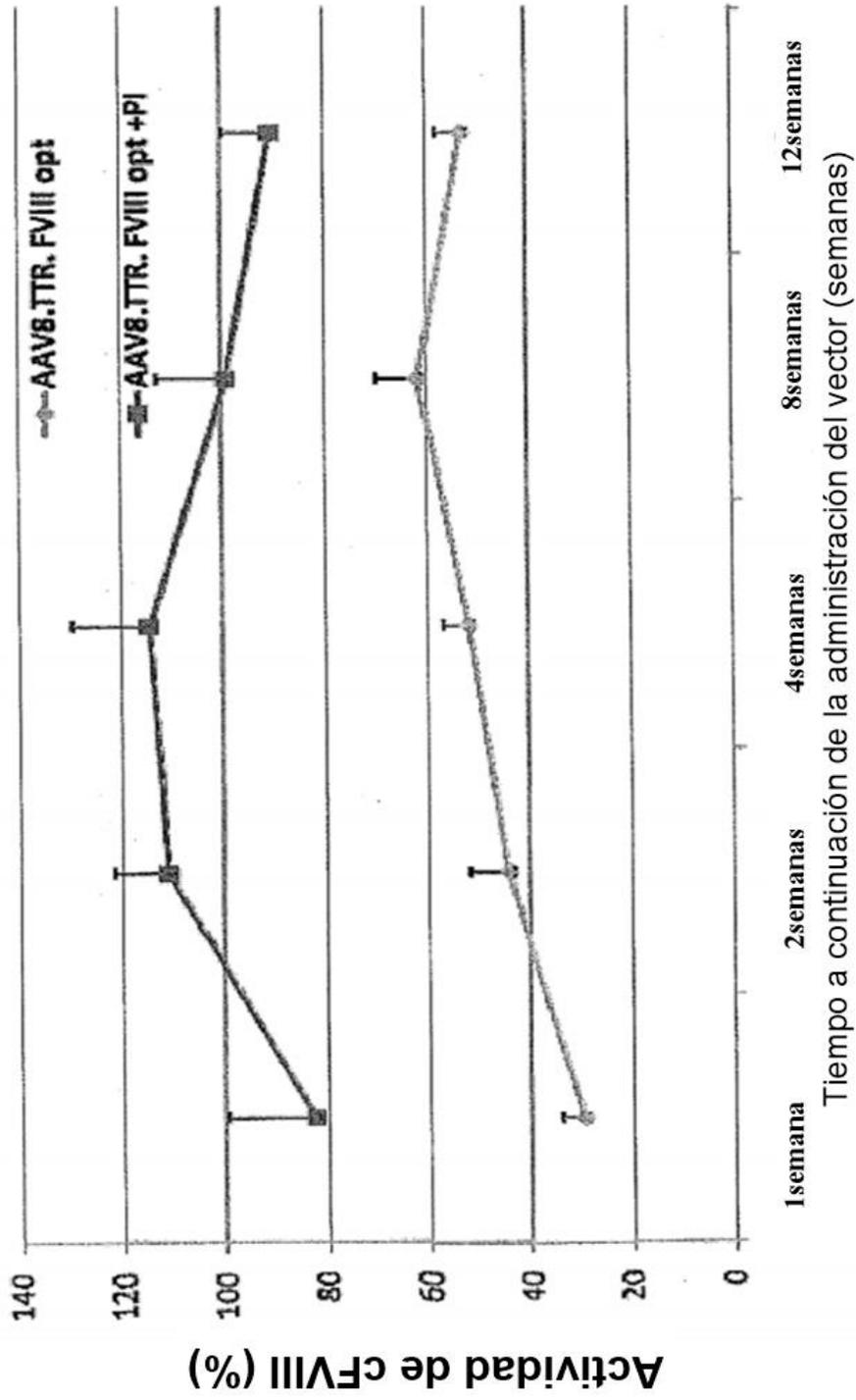


Figura 6

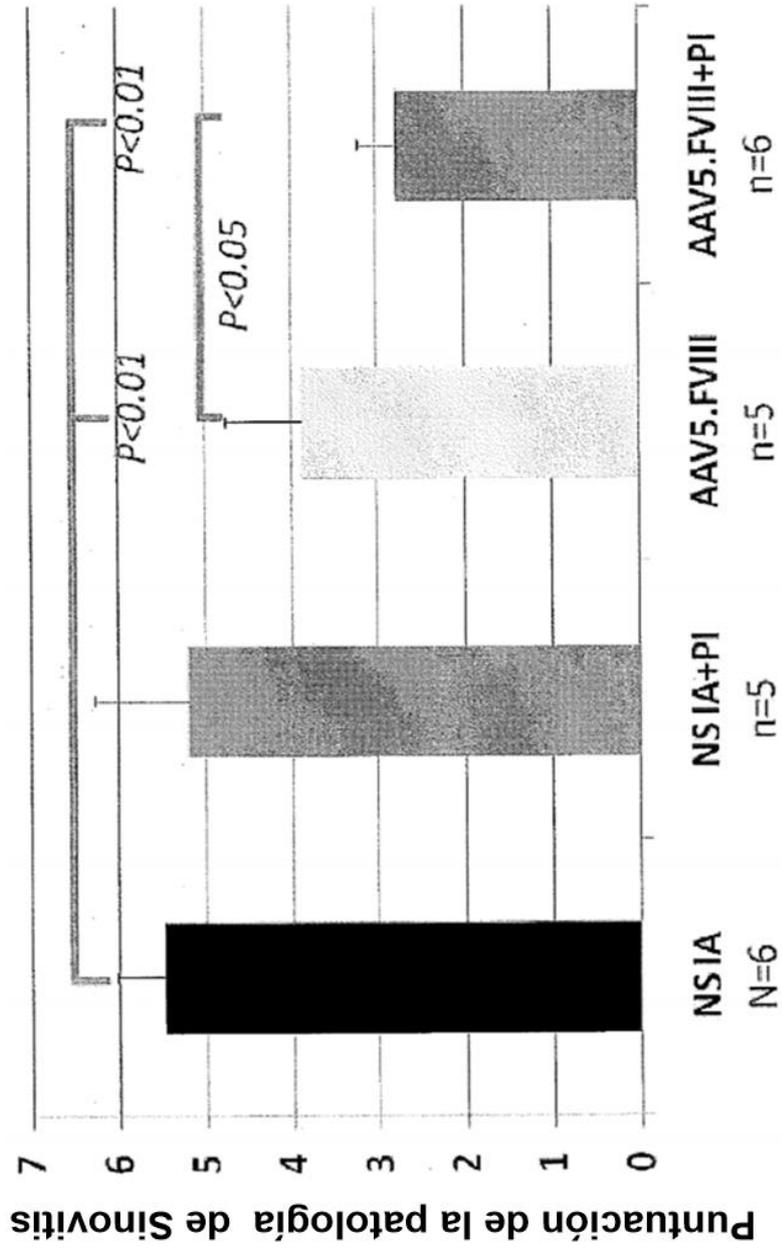


Figura 7