

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 634 118**

51 Int. Cl.:

C07K 14/075 (2006.01)

C12N 15/861 (2006.01)

A61P 21/00 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

A61P 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.02.2010 PCT/US2010/023885**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.08.2010 WO10093784**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.02.2010 E 10741720 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.05.2017 EP 2396343**

54 Título: **Vectores de virus modificados y métodos para fabricar y utilizar los mismos**

30 Prioridad:

11.02.2009 US 151736 P

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

26.09.2017

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:

**SAMULSKI, RICHARD, JUDE y
ASOKAN, ARAVIND**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 634 118 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

Vectores de virus modificados y métodos para fabricar y utilizar los mismos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a proteínas cápsido modificadas de cápsidos de virus y virus adeno asociados (AAV) y vectores de virus que comprenden los mismos. En particular, la invención se refiere a proteínas cápsido AAV modificadas y cápsidos que comprenden los mismos que se pueden incorporar en vectores de virus para conferir un perfil de transducción deseable con respecto a un tejido objetivo de interés.

Antecedente de la invención

15 Nuevas cepas de virus adeno asociado (AAV) aisladas de existencias adenovirales tejidos de animales han expandido el panel de los vectores AAV disponibles para aplicaciones de transferencia génica terapéutica. Extensos esfuerzos para mapear el tropismo de los tejidos de estos aislados de AAV en modelos animales actualmente están en curso. Por ejemplo, estudios recientes con serotipos AAV 1-9 indican un tropismo de tejido amplio en ratones luego de administración intravenosa. Los serotipos 8 y 9 AAV, son particularmente notables por su capacidad de transducir múltiples órganos que incluyen el corazón, hígado y músculo esquelético luego de administración intravenosa. Aunque los últimos serotipos son bien adecuados para modalidades de transferencia génica sistémica, la capacidad para dirigir el direccionamiento de vectores AAV a órganos selectivos es útil para terapia génica. El desarrollo de promotores específicos de tejido y las estrategias para regulación génica basadas en miARN para segregar agudamente patrones de expresión génica entre diferentes tipos de tejido, es digno de mención en este sentido. Sin embargo, dichos componentes regulatorios no precluyen el secuestro de genomas del vector AAV en órganos no objetivo luego administración sistémica.

25 Un aspecto particularmente llamativo de los tropismos de tejido mostrados por los serotipos AAV y variantes es su propensión a acumularse de forma ubicua dentro y transducir al hígado, aunque con eficiencia variable. La base molecular de este tropismo de hígado preferencial se ha mapeado, en el caso del AAV2 y AAV6, una huella básica continua que parece estar implicada en la interacción del serotipo con heparina. Específicamente, se ha demostrado previamente que un único residuo lisina en AAV6 (K531) dicta la capacidad de unión a heparina y por consiguiente, el tropismo de hígado. En el corolario, la mutagénesis sustitutiva del residuo de glutamato/aspartato correspondiente en los otros serotipos con un residuo lisina confiere unión a heparina, posiblemente al formar una huella básica continua mínima sobre la superficie del cápsido.

35 El presente inventor aborda una necesidad en la técnica de vectores de suministro de ácidos nucleicos con características deseables.

Resumen de la invención

40 Un método de muta génesis extensa produce tres grupos de proteínas de cápsido AAV modificadas que confieren fenotipos de sobre posición: (a) mutantes de proteína cápsido AAV que confieren propagación sistémica; (b) mutantes de proteína cápsido AAV que confieren separación del hígado; (c) mutantes de proteína cápsido AAV que confieren baja eficiencia de transducción en uno o más tejidos (por ejemplo, cerebro). De esta manera, se proporciona una matriz de vectores virales sintéticos que muestran un rango de perfiles de transducción que son adecuados para diferentes aplicaciones in vitro e in vivo.

50 La invención proporciona una proteína cápsido de virus adeno asociado 2 (AAV2) modificado selectivamente como se establece en la reivindicación 1, un cápsido AAV como se establece en la reivindicación 2, un vector de virus como se establece en las reivindicaciones 3 a 5, una formulación farmacéutica como se establece en la reivindicación 6, un método para administrar un ácido nucleico de una célula como se establece en la reivindicación 7, y un vector de virus o formulación farmacéutica para uso en el tratamiento como se establece en las reivindicaciones 8 a 10.

Estos y otros aspectos de la divulgación se tratan en más detalle en la descripción establecida de la invención adelante.

55 Breve descripción de los dibujos

Figura 1.

60 (a) Perfil de elución de cápsidos (superior) AAV2 parentales y AAV2i8 (inferiores) de una columna de afinidad de heparina. Las muestras se cargan (L) en columnas de afinidad de heparina-agarosa en 1xPBS, se lavan múltiples veces con 0.1xPBS (W1-4) y se eluyen en diferentes concentraciones de sal (0.15M a 1.5 M de NaCl). Se cargan fracciones recolectadas en una membrana de nitrocelulosa utilizando un colector de transferencia de puntos y detectado utilizando un anticuerpo monoclonal A20, específico para cápsidos AAV2 intactos. Las fracciones pico AAV2 se eluyen a ~300 mM NaCl, mientras que los cápsidos AAV2i8 eluyen bajo condiciones fisiológicas (pH 7.4; NaCl 0.15 M).

65

(b) Análisis de transducción in vitro de mutantes AAV2i en células HEK 293 no tratadas (barras negras) o tratadas con sialidasa 50mU/mL (barras blancas). Se determina los niveles de expresión de transgen luciferasa en lisatos celulares cosechados 24 horas postinfección con AAV2 o un mutante AAV2i (MOI 1000 vg/célula). Se incluye el AAV4 como un control positivo. Se realizan todos los experimentos por triplicado y se muestra la desviación estándar.

5

(c) Análisis de transducción in vitro de mutantes AAV2i en células CHOpgsD negativas para sulfato de heparina. Se determinan los niveles de expresión de transgen luciferasa en lisatosos de células cosechadas 24 horas postinfección con AAV2 o un mutante AAV2i (MOI 1000). Se realizan todos los experimentos por triplicado y se muestra la desviación estándar.

10

Figura 2.

(a) Análisis de transducción in vivo de mutantes de AAV2i a través de administración intramuscular. Se inyectan intramuscularmente ratones BALB/c (n=3) con vectores AAV2i CMV-Luc (dosis de 1×10^{10} vg en 200 μ L PBS). Se obtienen fotografías representativas e imágenes de bioluminiscencia de animales vivos de expresión transgénica de luciferasa 1 semana después de inyección. La escala de bioluminiscencia varía de $0-4 \times 10^6$ unidades de luz relativas (fotones/seg/cm²).

15

(b) Análisis de transducción in vivo de mutantes AAV2i a través de administración intravenosa. Se inyectan intravenosamente ratones BALB/c (n=3) (vena de la cola) con vectores AAV2i CMV-Luc (dosis de 1×10^{10} vg en 200 μ L de PBS). Se obtienen fotografías representativas e imágenes bioluminiscentes de animales vivos de expresión de transgen luciferasa a 1 semana después de inyección. La escala de bioluminiscencia varía de $0-4 \times 10^5$ unidades de luz relativas (fotones/seg/cm²).

20

Figura 3.

Comparación de los perfiles de transducción in vivo de AAV2 y AAV2i8 administrados a través de diferentes rutas de inyección intravenosa. Se inyectan ratones BALB/c con AAV2 o vector AAV2i8 CMV-Luc (dosis 4×10^{10} vg en 200 μ L de PBS) a través de la vena portal o de la cola. Se obtienen fotografías representativas e imágenes de bioluminiscencia de animales vivos de expresión transgénica de luciferasa a 1 semana después de inyección. La escala de bioluminiscencia varía de $0-2 \times 10^5$ unidades de luz relativas (fotones/seg/cm²).

30

Figura 4.

Comparación de transducción in vivo a través de administración intravenosa de vectores AAV2i con vectores AAV2 y AAV8. Se inyectan intravenosamente ratones BALB/c (n=3) (vena de la cola) con AAV2, AAV8, AAV2i8 y mutantes AAV2i estructuralmente relacionados (dosis 1×10^{11} vg en 200 μ L PBS) que empaca el casete (CBA)-Luc beta actina de pollo. Se obtienen fotografías representativas e imágenes bioluminiscentes de animales vivos de expresión transgénica de luciferasa. La escala de bioluminiscencia varía de $0-3 \times 10^6$ unidades relativas de luz (fotones/seg/cm²).

35

40

Figura 5.

Comparación de perfiles de transducción in vivo de AAV1i8 y AAV3i8. Se inyectan intravenosamente ratones BALB/c intravenosamente en la vena de la cola con vectores AAV1, AAV3, AAV1i8 o AAV3i8 (dosis 1×10^{11} vg en 200 μ L de PBS) que empaca el casete CBA-Luc. Se obtienen fotografías representativas e imágenes de bioluminiscencia de animales vivos de expresión transgénica de luciferasa a 1 semana después de inyección. La escala de bioluminiscencia varía de $1-3 \times 10^6$ unidades de luz relativa (fotones/seg/cm²).

45

Figura 6.

50

(a) Cuantificación de eficiencia de transducción de vectores AAV2i8 comparado con AAV2 y AAV8 en tejido cardíaco, músculo esquelético (músculos abdominales y de extremidades posteriores agrupados) y tejidos de hígado según se mide mediante expresión de luciferasa. Se obtienen lisatos de tejidos de ratones BALB/c (n=3) en 2 semanas después de administración de AAV2, AAV2i8 y AAV8 (dosis 1×10^{11} vg, vena de la cola) y se someten a análisis luminométrico. Se muestran niveles de luciferasa como unidades de luz relativa normalizado a niveles de la proteína normalizado utilizando un ensayo de Bradford. Las barras de error indican la desviación estándar.

55

(b) Cuantificación de eficiencia de transducción de vectores AAV2i8 comparado con AAV2 y AAV8 en tejido cardíaco, músculo esquelético (músculos abdominales y de extremidades posteriores agrupados) y tejidos de hígado según se mide mediante el número de copia de genoma de luciferasa través de Q-PCR. Se extrae ADN vector, así como genoma del anfitrión a partir de lisatos de tejidos obtenidos de ratones BALB/c (n=3) a 2 semanas después de administración de AAV2, AAV2i8 y AAV8 (dosis 1×10^{11} vg, vena de la cola). Se determina el número de copia del genoma de vector y anfitrión mediante Q-PCR con grupos cebadores específicos contra el gen lámina y el transgen luciferasa, respectivamente.

60

Figura 7.

65

5 Eficiencia de transducción in vivo de AAV2i8 de diversos grupos de músculos después de administración intravenosa. Expresión transgénica de luciferasa en subgrupos de músculo principales obtenidos de ratones BALB/c (n=3) a 2 semanas después de administración intravenosa en AAV2i8 (dosis 1×10^{11} vg, vena de la cola) que empaca el casete CBA-Luc. Lisatos de tejidos de cinco grupos de músculos diferentes del músculo esquelético de la pata trasera (barras blancas y negras alternas), tres grupos de pata delantera (barras blancas y negras alternas), músculos intercostales, cardíacos, faciales, diafragma, lengua, abdominal y vertebral (barras negras) se someten a análisis luminométrico. Los niveles de luciferasa se muestran como unidades de luz relativa normalizadas a niveles de la proteína determinados por un ensayo Bradford. Barras de error indican desviación estándar.

10 Figura 8.

15 Comparación de la distribución de AAV2i8 y vectores relacionados. Se inyectan ratones BALB/c con AAV2i8 o vectores relacionados que tienen un motivo Q/NxxTxP (dosis 1×10^{11} vg en 200 μ L PBS) que empaca el casete de CBA-Luc. Se determinan los números de copia de genoma de vector y anfitrón mediante Q-PCR con grupos de cebador específicos contra el gen lámina y el transgen luciferasa, respectivamente.

Figura 9.

20 (a) Expresión de transgen luciferasa en subgrupos musculoesqueléticos agrupados de extremidades posterior izquierda y derecha de ratones BALB/c (n=4) después perfusión aislada de AAV2i8 (barras negras) o AAV8 (barras grises) en cada vena safena. Los lisados de tejidos preparados después de administración de tres dosis diferentes (1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} vg) en volumen de inyección en bajo (200 μ L), medio (500 μ l) o alto (1 ml) que fueron sometidos a análisis luminométrico. Se muestran los niveles de luciferasa como unidades de luz relativa normalizado a niveles de proteína determinado utilizando un ensayo Bradford.

25 (b) Números de copia de genoma de vector recuperados de sangre en diferentes intervalos de tiempo después administración a través de la vena de la cola (n=3). Se extrae ADN de sangre entera y se analiza mediante Q-PCR con cebadores contra el transgén luciferasa. El AAV2i8 muestra circulación prolongada en comparación con AAV8. Las barras de error indican la desviación estándar.

30 Figura 10.

35 Cinéticas de expresión de transgén luciferasa en ratones luego de inyección intravenosa de vector AAV2i8 (dosis 1×10^{11} vg en 200 μ L PBS) que empaca el casete (CBA)-Luc. Se obtienen fotografías representativas de imágenes bioluminiscentes de animales vivos de expresión transgénica de luciferasa en diferentes intervalos de tiempo después de inyección (3 días, 1 semana, 4 semanas o 12 semanas).

Figura 11.

40 Comparación de perfiles de transducción in vivo de ratones 2i8D y 2i8E. Se inyecta intravenosamente ratones BALB/c a través de la vena de la cola con vectores AAV2, AAV8, AAV9, 2i8D o 2i8E (dosis 1×10^{11} vg en 200 μ L PBS) que empaca el casete CBA-Luc. Se obtienen fotografías representativas de imágenes bioluminiscentes de animales vivos de expresión transgénica luciferasa 4 días después de inyección.

45 Descripción detallada de la invención

50 La presente invención se describirá ahora con referencia a los dibujos acompañantes, en los que se muestran realizaciones representativas de la invención. Sin embargo, esta invención puede ser incorporada en diferentes formas y no se debe interpretar que limitan a las realizaciones establecidas aquí. Más bien, estas realizaciones se proporcionan de tal manera que esta divulgación será a fondo y completa y traspasará completamente el alcance de la invención a aquellos expertos en la técnica.

55 A menos que se defina de otra forma, todos los términos técnicos y científicos utilizados aquí tienen el mismo significado que lo entiende comúnmente el experto medianamente versado en la técnica a la que pertenece esta invención. La terminología utilizada en la descripción de la invención tiene aquí el propósito de describir realizaciones particulares únicamente y no pretende que limite la invención.

60 La designación de todas las posiciones de aminoácidos en las proteínas cápsido AAV en la descripción de la invención y las reivindicaciones adjuntas es con respecto a la numeración de subunidad cápsido VP1 (proteína cápsido AAV2 VP1 natural: GenBank accession No. AAC03780 o YP680426). El experto en la técnica entenderá que las modificaciones descritas aquí si se insertan en el gen cap AAV pueden resultar en modificaciones en las subunidades de cápsido VP1, VP2 y/o VP3. Alternativamente, las subunidades de cápsido se pueden expresar independientemente para alcanzar modificación en sólo uno o dos de las subunidades cápsido (VP1, VP2, VP3, VP1 + VP2, VP1 + VP3, o VP2 + VP3).

65 Definiciones.

Los siguientes términos se utilizan en la descripción aquí y las reivindicaciones adjuntas:

La forma singular “un,” “uno” y “el” también pretenden incluir las formas plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

5

Adicionalmente, el término “aproximadamente”, como se utiliza aquí cuando se refiere a un valor medible tal como una cantidad de longitud de una secuencia de polipéptidos o polinucleótidos, dosis, tiempo, temperatura, y similares, significa que abarca variaciones de $\pm 20\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, $\pm 1\%$, $\pm 0.5\%$ o incluso $\pm 0.1\%$ de la cantidad especificada.

10

También como se utiliza aquí, “y/o” se refiere a y abarca todas y cada una de las combinaciones posibles de uno o más de los artículos enumerados asociados, así como la falta de combinaciones cuando se interpreta en la alternativa (“o”).

A menos que el contexto indique lo contrario, se pretende específicamente que las diversas características de la invención descritas aquí se puedan utilizar en cualquier combinación.

15

Más aún, la presente invención también contempla que en algunas realizaciones de la invención, se puede excluir o se puede omitir cualquier característica o combinación de características establecidas aquí.

20

Para ilustración adicional, si, por ejemplo, la especificación indica que se puede seleccionar un aminoácido particular de A, G, I, L y/o V, este lenguaje también indica que el aminoácido se puede seleccionar de cualquier subconjunto de estos aminoácidos por ejemplo A, G, I o L; A, G, I y/o V; A o G; sólo L; etc. Como si cada tal subcombinación es estableciera expresamente aquí. Más aún, dicho lenguaje también indica que uno o más de los aminoácidos especificados pueden ser rechazados. Por ejemplo, en realizaciones particulares el aminoácido no es A, G o I; no es A; no es G o V; etcétera como si cada uno de dichos rechazos posibles se estableciera expresamente aquí.

25

Como se utiliza aquí, los términos “reduce”, “reduzca”, “reducción” y términos similares significan una reducción de por lo menos aproximadamente 25%, 35%, 50%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% o más.

30

Como se utiliza aquí, los términos “mejora,” “que mejora”, “mejora” y términos similares indican un aumento de por lo menos aproximadamente 25%, 50%, 75%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400%, 500% o más.

35

El término “parvovirus” como se utiliza aquí abarca la familia Parvoviridae, que incluye dependovirus y parvovirus que se replican autónomamente. Los parvovirus autónomos incluyen los miembros del género Parvovirus, Erythrovirus, Densovirus, Iteravirus, y Contravirus. Parvovirus autónomos de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, virus diminuto del ratón, parvovirus bovino, parvovirus canino, parvovirus de pollo, virus de panleucopenia felina, parvovirus felino, parvovirus del ganso, parvovirus H1, parvovirus de pato Muscovy, virus B19 y cualquier otro parvovirus autónomo conocido ahora o descubierto posteriormente. Se conocen otros parvovirus autónomos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, BERNARD N. FIELDS et al., VIROLOGY, volume 2, chapter 69 (4to ed., Lippincott-Raven Publishers).

40

Como se utiliza aquí, el término “virus adeno asociado” (AAV), incluye pero no se limitada a AAV tipo 1, tipo 2 de la AAV, AAV tipo 3 (que incluye tipos 3A y 3B), AAV tipo 4, tipo AAV 5, tipo 6 de la AAV, tipo AAV 7, tipo AAV 8, tipo AAV 9, tipo AAV 10, tipo AAV 11, AAV aviar, AAV bovina, AAV canina, AAV equino, AAV ovino, y cualquier otro AAV conocido ahora o que se descubra posteriormente. Véase, por ejemplo, BERNARD N. FIELDS et al., VIROLOGY, volume 2, Chapter 69 (4to ed., Lippincott-Raven Publishers). Se ha identificado una serie de clases y serotipos AAV relativamente nuevos (véase por ejemplo, Gao et al., (2004) J.Virology 78:6381-6388; Moris et al., (2004) Virology 33:375-383; y tabla 1).

45

Las secuencias genómicas de diversos serotipos de AAV y los parvovirus autónomos, así como las secuencias de las repeticiones de terminal natural (TR), proteínas Rep y subunidades cápsido se conocen en la técnica. Dichas secuencias se pueden encontrar en la bibliografía o en las bases de datos públicas tales como GenBank. Véase, Por ejemplo, números de acceso 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, X 01457, AF288061, AH009962, AY028226, AY028223, NC_001358, NC_001540, AF513851, AF513852, AY530579; véase también, por ejemplo, Srivistava et al., (1983) J. Virology 45:555; Chiorini et al., (1998) de J. Virology 71:6823; Chiorini et al., (1999) J. Virology 73:1309; Bantel Schaal et al., (1999) J. Virology 73:939; Xiao et al., (1999) J. Virology 73:3994; Muramatsu et al., (1996) 221:208 de virology; Shade et al., (1986) J. Virol. 58:921; Gao et al., (2002) Proc. NAT Acad. SCI. USA 99:11854; Moris et al., (2004) Virology 33:375-383; publicaciones de patentes internacionales WO 00/28061, WO 99/61601, WO 98/11244; y patente estadounidense No. 6,156,303. Véase también tabla 1.

50

55

60

Las estructuras de cápsido de parvovirus autónomo y AAV se describen en más detalle en BERNARD N. FIELDS et al., VIROLOGY, volumen 2, chapters 69 y 70 (4to ed., Lippincott-Raven Publishers). Véase también, descripción de estructura de cristal de AAV2 (Xie et al., (2002) Proc. Nat. Acad. Sci. 99:10405-10), AAV4 (padrón et al., (2005) J. Virol. 79:5047-58), AAV5 (Walters et al., (2004) J. Virol. 78:3361-71) y CPV (Xie et al., (1996) J. Mol. Biol. 6:497-520 y Tsao et al., (1991) Science 251:1456-64).

65

ES 2 634 118 T3

El término “tropismo” como se utiliza aquí se refiere a la entrada preferencial del virus en determinadas células o tejidos, seguido opcionalmente por la expresión (por ejemplo, transcripción y, opcionalmente, traducción) de unas secuencias llevadas por el genoma vírico en la célula, por ejemplo, para un virus recombinante, expresión de un ácido nucleico heterólogo de interés.

5

Tabla 1

Genomas completos	Número de Acceso GenBank.		Número de Acceso GenBank.		Número de Acceso GenBank.
		Hu T88	AY695375	Clase E	
virus Adeno-asociado 1	NC_002077, AF 063497	Hu T71	AY695374	Rh38	AY530558
virus Adeno-asociado 2	NC_001401	Hu T70	AY695373	Hu66	AY530626
virus Adeno-asociado 3	N_001729	Hu T40	AY695372	Hu42	AY530605
virus Adeno-asociado 3B	NC_001863	Hu T32	AY695371	Hu67	AY530627
virus Adeno-asociado 4	NC_001829	Hu T17	AY695370	Hu40	AY530603
virus Adeno-asociado 5	Y18065, AF085716	Hu LG15	AY695377	Hu41	AY530604
virus Adeno-asociado 6	NC_001862			Hu37	AY530600
AAV ATCC VR-865 Aviar	AY186198, AY629583, NC_004828	Clase C		Rh40	AY530559
DA-1 cepa AAV Aviar	NC_006263, AY629583	Hu9	AY530629	Rh2	AY243007
AAV Bovino	NC_005889, AY388617	Hu10	AY530576	Bb1	AY243023
		Hu11	AY530577	Bb2	AY243022
Clase A		Hu53	AY530615	Rh10	AY243015
AAV1	NC_002077, AF063497	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	AY530569
Clase B		Hu60	AY530622	Rh50	AY530563
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	AY530464
Hu28	AY530593	Clase D		Rh64	AY530574
		HuT88	AY695375	Clase E	
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	AVV7	AF513851	Clase 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 Clónico	
Hu45	AY530608		Cy3	AY243019		AAV5	Y18065, AF085716
Hu47	AY530610		Cy5	AY243017		AAV 3	NC_001729
Hu51	AY530613		Rh13	AY243013		AAV3B	NC_001863
Hu52	AY530614					AAV4	NC_001829
Hu T41	AY695378					Rh34	AY243001
Hu S17	AY695376					Rh33	AY243002
						Rh32	AY243003

5 Aquellos expertos en la técnica apreciarán que la transcripción de una secuencia de ácido nucleico heteróloga del genoma vírico puede no ser iniciada en la ausencia de factores de transacción, por ejemplo, para un promotor inducible o secuencia de ácido nucleico regulada de otra forma. En el caso de un genoma rAAV, la expresión génica del genoma vírico puede ser de un provirus integrado en forma estable, de un episoma no integrado, así como cualquier otra forma en la que el virus pueda entrar a la célula.

10 Como se utiliza aquí “tropismo sistémico” y “transducción sistémica” (y términos equivalentes) indican que el cápsido virus o vector de virus de la invención exhibe tropismo para o transduce, respectivamente, tejidos a través del cuerpo (por ejemplo, cerebro, pulmón, músculo esquelético, corazón, hígado, riñón y/o páncreas). En realizaciones de la invención se observa transducción sistémica de tejido muscular (Por ejemplo, músculo esquelético, músculo cardíaco y diafragma). En otras realizaciones, se alcanza la transducción sistémica de los tejidos musculo esqueléticos. Por ejemplo, en realizaciones particulares, todos los músculos esqueléticos a través del cuerpo se transducen (aunque la eficiencia de la transducción puede variar por tipo de músculo). En realizaciones particulares, se alcanza la transducción sistémica de
15 músculos de miembros, músculos cardíacos y músculos de diafragma. Opcionalmente, el cápsido de virus o el vector de virus se administran a través de una ruta sistémica (por ejemplo, ruta sistémica tal como intravenosamente, intraarticularmente o intralinfáticamente). Alternativamente, en otras realizaciones, el vector vírico o de cápsido se suministra localmente (por ejemplo, a la almohadilla de la pata, intramuscularmente, intradérmicamente, subcutáneamente, tópicamente). Ejemplos de vectores víricos modificados de acuerdo con la presente invención se proporcionan en la tabla 5 (véase también, figura 4)

25 A menos que se indique otra cosa, la “transducción eficiente” o “tropismo eficiente” o términos similares, se pueden determinar mediante referencia a un control adecuado (por ejemplo, por lo menos aproximadamente 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% o más de la transducción o tropismo, respectivamente, del control). En realizaciones particulares, el vector vírico transduce eficientemente o tiene tropismo eficiente para el músculo esquelético, músculo cardíaco, músculo de diafragma, páncreas (que incluye células β -islote) bazo, tubo gastrointestinal (por ejemplo, epitelio y/o músculo liso), células del sistema nervioso central, pulmón, células de articulaciones y/o riñón. Controles adecuados dependerán de una variedad de factores que incluyen el perfil de tropismo deseado. Por ejemplo, AAV8 y AAV9 son altamente eficientes en transducir el músculo esquelético, músculo cardíaco y músculo de diafragma, pero tienen la desventaja de que también
30 transducen el hígado con alta eficiencia. De esta manera, la invención se puede practicar para identificar vectores víricos de la invención que demuestran la transducción eficiente músculo esquelético, cardíaco y/o diafragma de AAV8 o AAV9, pero con una menor eficiencia de transducción para el hígado. Adicionalmente, debido al perfil de tropismo de interés puede reflejar el tropismo hacia múltiples tejidos objetivo, se apreciará que un vector adecuado puede representar algunas desventajas. Para ilustrar, un vector del virus de la invención puede ser menos eficiente que el AAV8 o AAV9 en transducir
35 el de músculo esquelético, músculo cardíaco y/o músculo de diafragma, pero debido al bajo nivel transducción del hígado, no obstante, puede ser muy deseable.

40 Del mismo modo, se puede determinar si un virus “no transduce eficientemente” o “no tiene tropismo eficiente” para un tejido objetivo, o términos similares, mediante referencia a un control adecuado. En realizaciones particulares, el vector de virus no transduce eficientemente (es decir, no tiene tropismo eficiente) para células hepáticas, renales, gónadas/germinales. En realizaciones particulares, la transducción indeseada de tejidos (por ejemplo, hígado) es 20% o menos, 10% o menos, 5% o menos, 1% o menos, 0.1% o menos del nivel de transducción de los tejidos objetivos deseados (por ejemplo, músculo esquelético, músculo del diafragma, músculo cardíaco y/o células del sistema nervioso central).

45 Como se utiliza aquí, el término “polipéptido” abarca tanto péptidos como proteínas, a menos que se indique de otra forma.

50 Un “polinucleótido” es una secuencia de una base de nucleótidos, y puede ser ARN, ADN o secuencias híbridas de ADN-ARN (que incluyen tanto nucleótidos de ocurrencia natural como de ocurrencia no natural), pero en realizaciones representativas son secuencias de ADN de cadena sencilla o cadena doble.

5 Como se utiliza aquí, un polinucleótido “aislado” (por ejemplo, “ADN aislado” o un “ARN aislado”) significa un polinucleótido por lo menos parcialmente separado de por lo menos algunos de los otros componentes del organismo de ocurrencia natural o virus, por ejemplo, componentes estructurales virales o celulares u otros polipéptidos o ácidos nucleicos comúnmente asociados con los polinucleótidos. En realizaciones representativas un nucleótido “aislado” se enriquece en por lo menos aproximadamente 10-veces, 100-veces, 1000-veces, 10.000-veces o más en comparación con el material de partida.

10 Del mismo modo, un polipéptido “aislado” significa un polipéptido que se separa por lo menos parcialmente de por lo menos algunos de los otros componentes del organismo de ocurrencia natural o virus, por ejemplo, los componentes estructurales virales o celulares u otros polipéptidos o ácidos nucleicos encontrados comúnmente asociados con los polipéptidos. En realizaciones representativas un polipéptido “aislado” se enriquece en por lo menos aproximadamente 10-veces, 100-veces, 1000-veces, 10.000-veces o más en comparación con el material de partida.

15 Como se utiliza aquí, por “aislar” o “purificar” (o equivalentes gramaticales) un vector vírico, significa que el vector vírico es por lo menos parcialmente separado de por lo menos algunos de los otros componentes del material de partida. En realizaciones representativas un vector vírico “aislado” o “purificado” se enriquece en aproximadamente por lo menos 10-veces, 100-veces, 1000-veces, 10.000-veces o más en comparación con el material de partida.

20 Un “polipéptido terapéutico” es un polipéptido que puede aliviar, reducir, evitar, retardar y/o estabilizar los síntomas que resultan de la ausencia o déficit de una proteína en una célula o sujeto y/o es un polipéptido que confiere de otra forma un beneficio a un sujeto, por ejemplo, efectos anti cáncer o mejora en la supervivencia de trasplante.

25 Los términos “tratar,” “trato” o “tratamiento de” (y sus variaciones gramaticales) significa que se reduce la severidad de la afección del sujeto, mejorada por lo menos parcialmente o estabilizada y/o que se alcanza algún alivio, mitigación, reducción o estabilización de por lo menos un síntoma clínico y/o existe un retardo en la progresión de la enfermedad o trastorno

30 Los términos “evitar”, “que evita” y “prevención” (y sus variaciones gramaticales) se refieren a la prevención y/o retardo del inicio de una enfermedad, trastorno y/o sistema clínico en un sujeto y/o una reducción en la severidad del inicio de la enfermedad, trastorno y/o síntomas clínicos en relación a lo que ocurriría en la ausencia de los métodos de la invención. La prevención puede ser completa, por ejemplo, la ausencia total de la enfermedad, trastorno y/o síntomas clínicos. La prevención también puede ser parcial, de tal manera que la ocurrencia de la enfermedad, trastorno y/o sistema clínico en el sujeto y/o la severidad en el inicio es menor de lo que ocurriría en la ausencia de la presente invención.

35 Una cantidad de “tratamiento efectivo” como se utiliza aquí es una cantidad que es suficiente para proporcionar alguna mejora o beneficio al sujeto. Una cantidad de “tratamiento efectivo” indicada alternativamente, es una cantidad que proporcionará algún alivio, mitigación, reducción, o estabilización en por lo menos un síntoma clínico en el sujeto. Aquellos expertos en la técnica apreciarán que los efectos terapéuticos no se necesitan completar o curar mientras que se proporcione algún beneficio al sujeto.

40 Una cantidad de “prevención efectiva” como se utiliza aquí es una cantidad que es suficiente para evitar y/o retardar el inicio de una enfermedad, trastorno y/o síntomas clínicos en un sujeto y/o para reducir y/o retardar la severidad del inicio de una enfermedad, trastorno y/o síntomas clínicos en un sujeto con relación a lo que ocurriría en la ausencia de los métodos de la invención. Aquellos expertos en la técnica apreciarán que no se necesita completar el nivel de prevención, mientras que se proporcione algún beneficio al sujeto.

50 Los términos “secuencia de nucleótidos heteróloga” y “ácido nucleico heterólogo” se utilizan aquí intercambiamente y se refieren a una secuencia que no es de ocurrencia natural en el virus. En general, el ácido nucleico heterólogo comprende un marco de lectura abierto que codifica un polipéptido o ARN no traducido de interés (por ejemplo, para suministro a una célula o sujeto).

55 Como se utiliza aquí, los términos “vector vírico,” “vector” o “vector de suministro de gen” se refiere a una partícula de virus (por ejemplo, AAV) que funciona como un vehículo de suministro de ácido nucleico, y que comprende el genoma de vector (por ejemplo, ADN viral [vADN]) empacado dentro de un virión. Alternativamente, en algunos contextos, el término “vector” se puede utilizar para referirse al genoma de vector/vADN solo.

60 Un “genoma de vector rAAV” o “genoma rAAV” es un genoma AAV (es decir, vADN) que comprende una o más secuencias de ácido nucleico heterólogas. Los vectores rAAV requieren generalmente solamente las repeticiones terminales (TR) en cis para generar virus. Todas las otras secuencias víricas se suministran y se pueden proporcionar en trans Muzyczka, Curr (1992). Topics Microbiol. Immunol. 158:97. Normalmente, el genoma de vector rAAV sólo retendrá uno o más secuencia TR con el fin de maximizar el tamaño del transgén que se puede empacar eficientemente por el vector. Se puede proporcionar secuencias de codificación de proteína estructural y no estructural en trans (por ejemplo, de un vector, tal como un plásmido, o al integrar establemente las secuencias en una célula de empaque). En realizaciones de la invención el genoma de vectores rAAV comprende por lo menos una secuencia de TR (por ejemplo, la secuencia de AAV TR), opcionalmente dos TR (por ejemplo, dos AAV TR), que normalmente estará en los extremos 5' y 3' del genoma de

vector y el flanco del ácido nucleico heterólogo, pero no necesitan estar contiguos a estos. Los TR pueden ser iguales o diferentes entre sí.

5 El término “repetición terminal” o “TR” incluye cualquier repetición terminal vírica o secuencia sintética que forma una estructura de horquilla y funciona como una repetición terminal invertida (es decir, media las funciones deseadas tal como replicación, empaque de virus, integración y/o rescate de pro virus y similares). El TR puede ser un AAV TR o no AAV TR. Por ejemplo, una secuencia no AAV TR tal como aquellas de otros parvovirus (por ejemplo, parvovirus canino (CPV), parvovirus de ratón (MVM), parvovirus humano B-19) o cualquier otra secuencia vírica adecuada (por ejemplo, la horquilla SV40 que sirve como el origen de la replicación SV40) se puede utilizar como TR, que se puede modificar adicionalmente mediante truncación, sustitución, eliminación, inserción y/o adición. Adicionalmente, el TR puede ser parcialmente o completamente sintético, tal como la” secuencia doble D” como se describe en la patente de los Estados Unidos no. 5.478.745 otorgada a Samulski et al.

15 Una “repetición de terminal AAV” o “AAV TR” puede ser de cualquier AAV, que incluye, pero no se limita a serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11 o cualquier otro AAV conocido ahora o descubierto después (véase, por ejemplo, tabla 1). Una repetición de terminal AAV no necesita tener una secuencia de repetición terminal natural, por ejemplo, se puede alterar una secuencia AAV TR natural mediante inserción, eliminación, truncado y/o mutación de sentido erróneo), mientras que la repetición terminal media las funciones deseadas, por ejemplo, replicación, empaque de virus, integración, y/o rescate de pro virus y similares.

20 Los vectores víricos de la invención pueden adicionalmente ser vectores de virus “dirigidos” (por ejemplo, que tiene un tropismo dirigido) y/o un parvovirus “híbrido” (es decir, en el que el TR vírico y el cápsido vírico son de diferentes parvovirus) como se describe en la publicación de patente internacional WO 00/28004 y Chao et al., (2000) Molecular Therapy2:619.

25 Los vectores víricos de la invención adicionalmente pueden ser partículas de parvovirus duplicadas como se describe en la publicación de patente internacional WO 01/92551. De esta manera, en algunas realizaciones, se pueden empacar genomas de cadena doble (dúplex) en cápsidos de virus de la invención.

30 Adicionalmente, los elementos genómicos o de cápsido víricos pueden contener otras modificaciones, que incluye inserciones, eliminaciones y/o sustituciones.

35 Como se utiliza aquí, el término “aminoácidos” abarca cualquier aminoácido de ocurrencia natural, formas modificadas de los mismos, y aminoácidos sintéticos.

En la tabla 2 se muestran aminoácidos levorotatorios (L-) de ocurrencia natural.

TABLA 2.

Residuo de Aminoácido	Abreviaturas	
	Código de tres letras	Código de una letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido Aspártico (Aspartato)	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Glutamina	Gln	Q
Ácido Glutámico (Glutamato)	Glu	E
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

Alternativamente, el aminoácido puede ser un residuo de aminoácido modificado (en la tabla 3 se muestran ejemplos no limitantes) y/o pueden ser un aminoácido que es modificado mediante modificación post traducción (por ejemplo, acetilación, amidación, formilación, hidroxilación, metilación, fosforilación o sulfatación).

5 TABLA 3.

Residuos de Aminoácido Modificados	Abreviaturas
Derivados del Residuo de Aminoácido	
Ácido 2- Aminoadípico	Aad
Ácido 3-Aminodaípico	bAad
Ácido Beta-Aminopropiónico, Beta-Alanina	bAla
Ácido 2-Aminobutírico	Abu
Ácido Piperídico, Ácido 4-Aminobutírico	4Abu
Ácido 6- Aminocaproico	Acp
Ácido 2-Aminoheptanoico	Ahe
Ácido 2-Aminoisobutírico	Aib
Ácido 3-Aminoisobutírico	bAib
Ácido 2-Aminopimelico	Apm
t-Butilamina	t-BuA
Citrulina	Cit
Ciclohexilalanina	Cha
Ácido 2,4-Diaminobutírico	Dbu
Desmosina	Des
Ácido 2,2'-Diaminopimélico	Dpm
Ácido 2,3-Diaminopropiónico	Dpr
N-Etilglicina	EtGly
N-Etilasparagina	EtAsn
Homoarginina	hArg
Homocisteína	hCys
Homoserina	hSer
Hidroxilisina	Hyl
Allo-Hidroxilisina	aHyl
3-Hidroxiprolina	3Hyp
4-Hidroxiprolina	4Hyp
Isodesmosina	Ide
Allo-Isoleucina	alle
Sulfóxido de Metionina	MSO
Sarcosina, N-Metilglicina	MeGly
N-Metilisoleucina	Melle
6-N-Metililsina	MeLys
N-Metilvalina	MeVal
2-Naftilalanina	2-Nal
Norvalina	Nva
Norleucina	Nle
Ornitina	Om
4-Clorofenilalanina	Phe(4-Cl)
2-Fluorofenilalanina	Phe(2-F)
3-Fluorofenilalanina	Phe(3-F)
4-Fluorofenilalanina	Phe(4-F)
Fenilglicina	Phg
Beta-2-Tienilalanina	Thi

Adicionalmente, el aminoácido de ocurrencia no natural puede ser un aminoácido "no natural" como se describe por Wang et al., Annu Rev Biophys Biomol Struct. 35:225-49 (2006)). Estos aminoácidos no naturales se pueden utilizar ventajosamente para enlazar químicamente moléculas de interés a una proteína de cápsido AAV.

Proteínas cápsido AAV modificadas y cápsidos de virus y vectores víricos que comprenden los mismos.

5 La presente invención proporciona proteínas cápsido AAV (VP1, VP2 y/o VP3) que comprenden una modificación en la
 secuencia de aminoácido en el bucle de eje de tres pliegues 4 (Key et al., J. Virol. 77:6995-7006 (2003)) y cápsidos de
 virus y vectores víricos que comprenden la proteína de cápsido AAV modificada. Los inventores han descubierto que las
 10 modificaciones en este bucle pueden conferir una o más propiedades deseables a vectores víricos que comprenden la
 proteína cápsido AAV modificada que incluye sin limitación (i) transducción reducida de hígado, (ii) movimiento mejorado
 a través de las células endoteliales, (iii) transducción sistémica; (iv) transducción mejorada de tejido muscular (por ejemplo,
 15 músculo esquelético, músculo cardíaco y/o músculo de diafragma), y/o (v) transducción reducida de tejido cerebral (por
 ejemplo, neuronas). De esta manera, la presente invención supera algunas de las limitaciones asociadas con los vectores
 AAV convencionales. Por ejemplo, los vectores basados en los vectores AAV8 y rAAV9 son atractivos para el suministro
 de ácido nucleico sistémico debido a que cruzan fácilmente la barrera de células endoteliales; sin embargo, la
 administración sistémica de rAAV8 o rAAV9 resulta en la mayoría de vectores que se suministran al hígado, reduciendo
 por lo tanto la transducción de otros tejidos objetivos importantes tales como el músculo esquelético.

20 En realizaciones de la invención, la transducción del músculo cardíaco y/o músculo esquelético (determinado sobre la
 base de un músculo esquelético individual, múltiples músculos esqueléticos, o un rango completo de músculos
 esqueléticos) es de por lo menos aproximadamente cinco veces, diez veces, 50 veces, 100 veces, 1000 veces o más de
 niveles de transducción en hígado.

25 En realizaciones particulares, la proteína cápsido AAV modificada de la invención comprende una o más modificaciones
 en la secuencia de aminoácido del bucle de eje de tres pliegues 4 (por ejemplo, aminoácidos en las posiciones 575 a 600
 [inclusive] de la proteína cápsido AAV2 VP1 natural. Como se utiliza aquí, una "modificación" en una secuencia de
 aminoácido incluye sustituciones, inserciones y/o eliminaciones.

30 Como se describe aquí, las secuencias de ácido nucleico y aminoácido de las proteínas cápsido de un número de AAV
 se conocen en la técnica. De esta manera, se puede determinar fácilmente los aminoácidos "correspondientes" a las
 posiciones de aminoácidos 575 a 600 (inclusive) o posiciones de aminoácidos 585 a 590 (inclusive) de la proteína cápsido
 AAV2 natural mediante cualquier otro AAV (por ejemplo, al utilizar alineaciones de secuencias).

35 Aquellos expertos en la técnica comprenderán que se conoce en la técnica una variedad de manipulaciones a las proteínas
 cápsido AAV y la invención no se limita a modificaciones de proteínas cápsido AAV de ocurrencia natural. Por ejemplo, la
 proteína cápsido que se va a modificar puede ya tener alteraciones como se compara con las AAV de ocurrencia natural
 (por ejemplo, se deriva de una proteína de cápsido AAV de ocurrencia natural, por ejemplo, AAV2). Dichas proteínas
 cápsido AAV también están dentro del alcance de la presente invención.

40 Por ejemplo, la proteína cápsido AAV que se va a modificar puede comprender una inserción de aminoácido directamente
 luego del aminoácido 264 de la secuencia de proteínas cápsido AAV2 natural (véase, por ejemplo, WO 2006/066066) y/o
 puede ser un AAV con un bucle HI alterado como se describe en el documento WO 2009/108274 y/o puede ser un AAV
 que se modifica para contener una secuencia poly-His para facilitar la purificación. Como otro ejemplo de ilustración, la
 proteína cápsido AAV puede tener una secuencia que dirige péptidos incorporada allí como una inserción o sustitución.

45 De esta manera, en realizaciones particulares, la proteína cápsido AAV que se va a modificar se puede derivar de un AAV
 de ocurrencia natural pero comprende adicionalmente una o más secuencias externas (por ejemplo, que son exógenas
 al virus natural) que se insertan y/o que sustituyen en la proteína cápsido y/o han sido alteradas mediante eliminación de
 uno o más aminoácidos.

50 El término "Proteína cápsido AAV2" incluye proteínas cápsido AAV que tienen la secuencia de proteína cápsido AAV2
 natural (véase número de acceso GenBank AAC03780) así como también aquellas que comprenden sustituciones,
 inserciones y/ o eliminaciones (como se describe en el párrafo precedente) en la secuencia de proteína cápsido AAV2
 natural.

55 En realizaciones particulares, la proteína cápsido AAV tiene la secuencia de la proteína cápsido AAV natural o tiene una
 secuencia de aminoácidos que es por lo menos aproximadamente 90%, 95%, 97%, 98% o 99% similar o idéntica a una
 secuencia de proteína cápsido AAV natural. Por ejemplo, en realizaciones particulares, una proteína cápsido "AAV2"
 abarca la secuencia de proteína cápsido AAV2 naturales así como también las secuencias que tiene por lo menos
 aproximadamente 90%, 95%, 97%, 98% o 99% de similitud o idéntica con la secuencia de proteína cápsido AAV2 natural.

60 Los métodos para determinar la similitud de secuencia o identidad entre dos o más secuencias de aminoácidos se conocen
 en la técnica. La similitud de secuencias o identidad se puede determinar utilizando las técnicas estándar, conocidas en
 el arte, que incluyen, pero no se limitan a, el algoritmo de identidad de secuencia local de Smith y Waterman, Adv. Appl.
 Math. 2, 482 (1981), mediante el algoritmo de alineación de identidad de secuencia de Needleman y Wunsch, J. analizar
 Biol 48.443 (1970), mediante la búsqueda por el método de similitud de Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA
 65 85,2444 (1988), mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en

el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 ciencia Drive, Madison, WI), el programa de secuencia Best Fit descrito por Devereux et al., Nucl. Ácidos res. 12, 387-395 (1984), o mediante inspección.

5 Otro algoritmo adecuado es el algoritmo BLAST, descrito en Altschul et al., J. analizar Biol 215, 403-410, (1990) y Karlin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 5873-5787 (1993). Un programa BLAST particularmente útil es el programa WU-BLAST-2 que es obtenido de Altschul et al., métodos en enzimología, 266, 460-480 (1996); <http://Blast.wustl.edu/Blast/README.html>. El WU-BLAST-2 utiliza diversos parámetros de búsqueda, que se fijan opcionalmente a los valores predeterminados. Los parámetros son valores dinámicos y se establecen mediante el programa propiamente dicho dependiendo de la composición de la secuencia particular y la composición de las bases de datos particulares contra las
10 cuales se está buscando la secuencia de interés; sin embargo, los valores se pueden ajustar para aumentar la sensibilidad.

Adicionalmente, un algoritmo útil adicional es el BLAST con espacios como se reporta por Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25, 3389-3402.

15 En realizaciones representativas de la invención, se hace una modificación en la región de las posiciones de aminoácidos 585 a 590 (inclusive) de la proteína cápsido AAV2 natural (utilizando numeración VP1) (proteína cápsido AAV2 VP1 natural: número de acceso GenBank AAC03780 o YP680426), es decir, en los aminoácidos que corresponden a las posiciones de aminoácidos 585 a 590 (numeración VP1) de la proteína cápsido AAV2 natural. Las posiciones de aminoácido en los cápsidos AAV modificado que "corresponde a" las posiciones 585 a 590 de la proteína cápsido AAV2
20 natural será evidente para aquellos expertos en la técnica y se puede determinar fácilmente utilizando las técnicas de alineación de secuencia (véase, por ejemplo, figura 7 del documento WO 2006/066066) y/o análisis de estructura de cristal (Padron et al., (2005) J. Virol. 79:5047-58).

25 Para ilustrar, la modificación se puede introducir en una proteína cápsido AAV que ya contiene inserciones y/o eliminaciones de tal manera que la posición de todas las secuencias en la dirección 3' se cambia. En esta situación, las posiciones de aminoácidos que corresponden a las posiciones de aminoácidos 585 a 590 en la proteína cápsido AAV2 sería fácilmente identificable para aquellos expertos en la técnica. Para ilustración, la proteína cápsido puede ser una proteína cápsido AAV2 que contiene una inserción luego de la posición 264 de aminoácidos (véase, por ejemplo, documento WO 2006/066066). Los aminoácidos encontrados en las posiciones 585 a 590 (por ejemplo, RGNRQA en la proteína cápsido AAV2 natural) estaría ahora en las posiciones 586 a 591 pero serían aún identificables por aquellos
30 expertos en la técnica.

La invención también proporciona un cápsido de virus AAV que comprende, que consiste esencialmente o consiste de la proteína de cápsido AAV modificada de la invención. En realizaciones particulares, el cápsido vírico es un cápsido de parvovirus, que puede adicionalmente ser un cápsido de parvovirus autónomo o un cápsido de pendovirus. En realizaciones particulares, el cápsido AAV es un AAV1, AAV2, AAV3a, AAV3b, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11 o cualquier otros AAV mostrado en la tabla 1 o se deriva de cualquiera de los anteriores mediante una o más inserciones, sustituciones y/o eliminaciones.

40 Los cápsidos de virus modificados se pueden utilizar como "vehículos de cápsidos", como se ha descrito, por ejemplo, en la Patente Estadounidense No. 5.863.541. Las moléculas que pueden empacar mediante el cápsido de virus modificado y transferido en una célula incluyen ADN heterólogo, ARN, polipéptidos, moléculas orgánicas pequeñas, metales o combinaciones de los mismos.

45 Las moléculas heterólogas se definen como aquellas que no se encuentran en forma natural en una infección AAV, por ejemplo, aquellas no codificadas por un genoma AAV tipo natural. Adicionalmente, las moléculas útiles terapéuticamente pueden asociarse con el exterior del cápsido de virus quimérico para transferencia de las moléculas en las células objetivo anfitrión. Dichas moléculas asociadas pueden incluir ADN, ARN, moléculas orgánicas pequeñas, metales, carbohidratos, lípidos y/o polipéptidos. En una realización de la invención, la molécula particularmente útil se liga covalente (es decir, se conjuga o acopla químicamente) a las proteínas cápsido. Los métodos para ligar covalentemente las moléculas son conocidos por los expertos en la técnica.
50

Los cápsidos de virus modificados de la invención también hallan uso en la creación de anticuerpos contra estructuras de cápsidos novedosas. Como una alternativa adicional, se puede insertar una secuencia de aminoácidos exógena en el cápsido de virus modificado para presentación de antígeno a una célula, por ejemplo, para administración a un sujeto para producir una respuesta inmunitaria a la secuencia de aminoácidos exógena.
55

En otras realizaciones, los cápsidos de virus se puede administrar para bloquear determinados sitios celulares antes de y/o concurrentemente con (por ejemplo, dentro de minutos u horas entre sí) administración de un vector vírico que suministra un ácido nucleico que codifica un polipéptido o ARN funcional de interés. Por ejemplo, los cápsidos de la invención se pueden suministrar para bloquear receptores celulares en células hepáticas y un vector de suministro se puede administrar posteriormente o concurrentemente, que puede reducir la transducción de células hepáticas y por lo tanto la transducción de otros objetivos (por ejemplo, músculos esqueléticos, cardiacos y/o diafragma).
60

65 De acuerdo con realizaciones representativas, los cápsidos de virus modificado se pueden administrar a un sujeto antes de y/o concurrentemente con un vector de virus modificado de acuerdo con la presente invención. Adicionalmente, la

invención proporciona composiciones y formulaciones farmacéuticas que comprenden los cápsidos de virus modificados de la invención; opcionalmente, la composición también comprende un vector vírico modificado de la invención.

5 También se proporcionan ácidos nucleicos (opcionalmente, ácidos nucleicos aislados) que codifican los cápsidos de virus modificados y proteínas cápsido de la invención. Adicionalmente se proporcionan vectores que comprenden los ácidos nucleicos, y células (en vivo o en cultivo) que comprenden los ácidos nucleicos y/o vectores. Vectores adecuados incluyen sin limitación vectores víricos (por ejemplo, adenovirus, AAV, herpesvirus, vaccinia, poxvirus, baculovirus, y similares) plásmidos, fago, YAC, BAC, y similares. Dichos ácidos nucleicos, vectores y células se pueden utilizar, por ejemplo, como reactivos (por ejemplo, construcciones de empaque auxiliar o células de empaque) para la producción de cápsidos de virus modificado o vectores víricos como se describe aquí.

Los cápsidos de virus de acuerdo con la invención se pueden producir utilizando cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, mediante expresión de un baculovirus (Brown et al., (1994) *Virology* 198:477-488).

15 Las modificaciones a la proteína cápsido AAV de acuerdo con la presente invención son modificaciones "selectivas". Este método está en contraste con trabajos anteriores con la subunidad completa o cambios de unión grande entre serotipos AAV (véase, por ejemplo., publicación de patente internacional WO 00/28004 y Hauck et al., (2003) *J. Virology* 77:2768-2774). En la invención reivindicada la modificación "selectiva" resulta en la inserción y/o sustitución y/o eliminación de menos de 20, 18, 15, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 o 3 aminoácidos contiguos.

20 El cápsido de virus puede ser un cápsido de virus dirigido que comprende una secuencia objetivo (por ejemplo, sustituido o insertado en el cápsido vírico) que dirige el cápsido vírico para interactuar con las moléculas de superficie celular presentes en un tejido objetivo deseado (véase, por ejemplo., publicación de patente internacional WO 00/28004 y Hauck et al., (2003) *J. Virology* 77:2768-2774); Shi et al., *Human Gene Therapy* 17:353-361 (2006) [que describe la inserción del motivo de unión de receptor de integrina RGD en la posición 520 y/o 584 de la subunidad de cápsido AAV]; y la patente estadounidense No. 7,314,912 [que describe la inserción del péptido P1 que contiene un motivo RGD y luego de las posiciones de aminoácidos 447, 534, 573 y 587 de la subunidad de cápsido AAV2]. Otras posiciones dentro de la subunidad de cápsido AAV que toleran las inserciones son conocidas en la técnica (por ejemplo, posiciones 449 y 588 descritas por Grifman et al., *Molecular Therapy* 3:964-975 (2001)).

30 Por ejemplo, algunos de los cápsidos víricos de la invención tienen tropismo relativamente ineficiente hacia la mayor parte los tejidos objetivo de interés (por ejemplo, hígado, músculo esquelético, corazón, músculo de diafragma, riñón, cerebro, estómago, intestinos, piel, células endoteliales, y/o pulmones). Una secuencia objetivo se puede incorporar ventajosamente en estos vectores de baja-transducción para conferir por lo tanto al cápsido vírico un tropismo deseado y, opcionalmente, tropismo selectivo para tejidos particulares. Las proteínas cápsido AAV, cápsidos y vectores que comprenden las secuencias objetivo se describen, por ejemplo, en la publicación de patente internacional WO 00/28004. Como otra posibilidad de uno o más aminoácidos de ocurrencia no natural como se describe por Wang et al., *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 35:225-49 (2006)) se puede incorporar en la subunidad de cápsido AAV en un sitio ortogonal como unos medios para redirigir un vector de baja transducción a un tejido objetivo deseado. Estos aminoácidos no naturales se pueden utilizar ventajosamente para vincular químicamente moléculas de interés a la proteína cápsido AAV que incluye, sin limitación: glicanos (dirigido a células dendríticas-manosa); RGD, bombesina o un neuropéptido para suministro dirigido a tipos de células de cáncer específicas; aptámeros ARN o péptidos seleccionados de la exposición de fago dirigido a receptores de superficie de célula específica tal como receptores de factor de crecimiento, integrinas, y similares. Los métodos para modificar químicamente los aminoácidos se conocen en la técnica (véase, por ejemplo., Greg T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, 1st edition, Academic Press, 1996).

50 En realizaciones representativas, la secuencia objetivo puede ser una secuencia de cápsido de virus (por ejemplo, una secuencia de cápsido de parvovirus autónomo, secuencia de cápsido AAV, o cualquier otra secuencia de cápsido vírica) que dirige la infección a un tipo de célula particular.

Como otro ejemplo no limitante, un dominio de unión a heparina (por ejemplo, el dominio de unión a heparina de virus sincitial respiratorio) se puede insertar o sustituir en una subunidad que no une típicamente los receptores HS o (por ejemplo, 4 AAV, AAV5) para conferir unión de heparina al mutante resultante.

55 El B19 infecta las células progenitoras eritroides primarias utilizando globósido como su receptor (Brown et al., (1993) *Science* 262:114). La estructura del B19 ha sido determinada a resolución de 8 Å (Agbandje-McKenna et al., (1994) *Virology* 203:106). La región de cápsido B19 que se une a globósido ha sido mapeada entre los aminoácidos 399-406 (Chapman et al., (1993) *Virology* 194:419), una región en bucle entre las estructuras β -cilindro E y F (Chipman et al., (1996) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 93:7502). De acuerdo con lo anterior, el dominio de unión receptor de globósido del cápsido B19 se puede sustituir en la proteína de cápsido AAV para dirigir un cápsido de virus o vector vírico que comprende el mismo para células eritroides.

65 En realizaciones representativas, la secuencia de objetivo exógena puede ser cualquier secuencia de aminoácidos que codifican un péptido que altera el tropismo de un cápsido de virus o vector de virus que comprende la proteína de cápsido AAV modificada. En realizaciones particulares, el péptido objetivo o proteína puede ser de origen natural o, alternativamente, completamente o parcialmente sintético. Ejemplos de secuencias objetivo incluyen ligandos y otros

péptidos que se unen a los receptores de superficie celular y glucoproteínas, tal como secuencias de péptidos RGD, bradiquinina, hormonas, factores de crecimiento de péptidos (por ejemplo, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento neuronal, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factores I y II de crecimiento similar a insulina, etcétera), citoquinas, hormona de estimulación de melanocitos (por ejemplo, α , β o γ), neuropéptidos y endorfinas y similares y fragmentos de los mismos que retienen la capacidad de dirigir células a sus receptores cognato. Otros péptidos de ilustración y proteínas incluyen sustancia P, factor de crecimiento de queratinocitos, neuropéptido Y, péptido de liberación de gastrina, interleucina 2, lisozima de clara de huevo de gallina, eritropoyetina, gonadoliberina, corticostatina, β -endorfina, leu-encefalina, rimorfina, α -neo-encefalina, angiotensina, neumadina, péptido intestinal vasoactivo, neurotensina, motilina y fragmentos de los mismos como se describió anteriormente. Como aún una alternativa adicional, el dominio de unión de una toxina (por ejemplo, toxina tetanos o toxinas de serpiente, tal como α -Bungarotoxina, y similares) se pueden sustituir en la proteína cápsido como una secuencia objetivo. En un aún una realización representativa adicional, la proteína cápsido AAV se puede modificar mediante sustitución de un péptido de señal de importación/exportación "no clásica" (por ejemplo, factor 1 y 2 de crecimiento de fibroblastos, interlauquina 1, proteína VIH-1Tat, proteína VP22 del virus del herpes, y similares) como se describe por Cleves (Current Biology 7:R318 (1997)) en la proteína de cápsido AAV. También se abarcan péptidos motivos que dirigen la captación mediante células específicas, por ejemplo, activadores de motivos de péptido FVFLP mediante células hepáticas.

Las técnicas de exhibición de fagos, así como otras técnicas conocidas en el arte, se pueden utilizar para identificar péptidos que reconocen cualquier tipo de célula de interés.

Las secuencias objetivo pueden codificar cualquier péptido que se dirija a un sitio de unión de superficie celular, que incluyen receptores (por ejemplo, proteínas, carbohidratos, glucoproteína o proteoglicanos). Ejemplos de sitios de unión de superficie celular incluyen, pero no se limitan a, sulfato de heparán, sulfato de condroitina, y otros glucosaminoglicanos, grupos funcionales de ácidos siálicos encontrados en mucinas, glucoproteína, y gangliósidas, glucoproteínas MHC1, componentes de carbohidratos encontrados en glucoproteínas de membrana, que incluyen, manosa, n-acetilgalactosamina, N-acetil-glucosamina, fucos, galactosa y similares.

En realizaciones particulares, un sulfato de heparán (HS) o dominio de unión a heparina se sustituye en el cápsido de virus (por ejemplo, en un AAV que de otra forma no se une al HS o heparina). Se conoce en la técnica que la unión de HS/heparina está mediada por un "parche básico" que es rico en argininas y/o lisinas. En realizaciones de ejemplo, una secuencia que sigue al motivo BXXB, en el que "B" es un residuo básico y X es neutro y/o hidrófobo. Como un ejemplo no limitante, BXXB es RGNR. En realizaciones particulares, BXXB se sustituye por las posiciones de aminoácidos 262 a 265 en la proteína cápsido AAV2 natural o la posición correspondiente en la proteína de cápsido de otro AAV.

Ejemplos no limitantes de secuencias objetivo adecuadas incluyen los péptidos que se dirigen a células endoteliales de arterias coronarias identificados por M Iler et al., Nature Biotechnology 21:1040-1046 (2003) (consensus sequences NSVRDLG/S, PRSVTVP, NSVSSXS/A; véase también tabla 2); péptidos dirigidos a tumor descrito Grifman et al., Molecular Therapy 3:964-975 (2001) (por ejemplo, NGR, NGRAHA); secuencias que se dirigen a cerebro o pulmón como se describe por Work et al. Molecular Therapy 13:683-693 (2006) (QPEHSST, VNTANST, HGPMQKS, PHKPLA, IKNNEMW, RNLDTPM, VDSHRQS, YDSKTKT, SQLPHQK, STMQQNT, TERYMTQ, QPEHSST, DASLSTS, DLPNKKT, DLTAARL, EPHQFNY, EPQSNHT, MSSWPSQ, NPKHNAT, PDGMRTT, PNNKTT, QSTTHDS, TGSKQKQ, SLKHQAL y SPIDGEC, véase también tabla 1)); secuencias de objetivo vascular descritas por Hajitou et al., TCM 16:80-88 (2006) (WIFPWIQL, CDCRGDCFC, CNGR, CPRECE, GSL, CTHWGF TLC, CGRRAGGSC, CKGGRAKDC, y CVPELGHEC); péptidos objetivos como se describe por Koivunen et al., J. Nucl. Med. 40:883-888 (1999) (CRRETAWAK, KGD, VSWFSHRYSPFAVS, GYRDGYAGPILYN, XXXY*XXX [en el que Y* es fosfo-Tyr], Y* E/MNW, RPLPPLP, APPLPPR, DVFYPPYASGS, MYWYPY, DITWDQLWDLMK, CWDDG/LWLC, EWCEYLGGYLRCYA, YXCXXGPXTWXCXP, IEGPTLRQWLAARA, LWXXY/W/F/H, FXXYLW, SSIHFRWGLCD, MSRPACPPNDKYE, CLRSGRGC, CHWMFSPWC, WXXF, CSSRLDAC, CLPVASC, CGFECVRQCPERC, CVALCREACGEGC, SWCEPGWCR, YSGKWGW, GLSGGRS, LMLPRAD, CSCFRDVCC, CRDVVSVIC, CNGR y GSL; véase también tablas 1, 2 y 3); y péptidos dirigidos a tumor, como lo describe Newton & Deutscher, Phage Peptide Display in Handbook of Experimental Pharmacology, pages 145-163, Springer-Verlag, Berlin (2008) (MARSGL, MARAKE, MSRTMS, KCCYSL, WRR, WKR, WVR, WVK, WIK, WTR, WVL, WLL, WRT, WRG, WVS, WVA, MYWGDHSHWLQYWE, MQLPLAT, EWLS, SNEW, TNYL, WIFPWIQL, WDLAWMFRLPVG, CTVALPGGYVRVC, CVPELGHEC, CGRRAGGSC, CVAYCIEHHCWTC, CVFAHNYDYLVLC, y CVFTSNYAFC, VHSPNKK, CDCRGDCFC, CRGDGWC, XRGCDX, PXXS/T, CTHWGF TLC, SGKGRQITAL, A9A/Q(N/A)(L/Y)(T/V/M/R)(R/K), VYMSPF, MQLPLAT, ATWLPPR, HTMYHHYQHHL, SEVGCRAQLWLCEKYFG, CGLLPVGRPDRNVWRWLC, CKGQCDRFKGLPWE, SGRSA, WGFP, LWXXAr [Ar=Y, W, F, H), FXXYLW, AEPMPHSLNFSQYLWYT, WAY(W/F)SP, IELLQAR, DITWDQLWDLMK, AYTKCSRQWRTCTMTH, PQNSKIPGPTFLDPH, SMEPALPDWWWKMFK, ANTPCGPYTHDCPVKR, TACHQHVRMVRP, VPWMEPAYQRFL, DPRATPGS, FRPNRAQDYNTN, CTKNSYLMC, C R (Q) L/RT(G/N) XXG(A/V) GC, CPIEDRPMC, HEWSYLAPYPWF, MCPKHPLGC, RMWPSSTVNLSAGRR, SAKTAVSQRVWLPSHRGGEP, KSREHVNSACPSKRITAAL EGFR, RVS, AGS, AGLGVR, GGR, GGL, GSV, GVS, GTRQGHMRLGVS DG, IAGLATPGWSHWLAL, SMSIARL, HTFEPGV, NTSLKRISNKRIIRRK, LRIKRKRKRKTRK, GGG, GFS, LWS, EGG, LLV, LSP, LBS, AGG, GRR, GGH y GTV; véase también tabla 1).

Como aun una alternativa adicional, la secuencia objetivo puede ser un péptido que se puede utilizar para acoplamiento químico (por ejemplo, puede comprender residuos arginina y/o lisina que se pueden acoplar químicamente a través de sus grupos R) a otra molécula que dirige la entrada en una célula.

5 Como otra opción, la proteína cápsido AAV o el cápsido virus de la invención puede comprender una mutación como se describe en el documento WO 2006/066066. Por ejemplo, la proteína cápsido puede comprender una sustitución de aminoácido selectiva en la posición de aminoácido 263, 705, 708 y/o 716 de una proteína cápsido AAV2 natural. Adicionalmente, o alternativamente, en realizaciones representativas, la proteína cápsido, el cápsido de virus o vector
10 comprende una inserción de aminoácidos selectiva directamente luego de una posición de aminoácidos 264 de la proteína de cápsido AAV2. Por "seguir directamente la posición X de aminoácido" se pretende que la inserción siga inmediatamente a la posición de aminoácidos indicada (por ejemplo, "seguir la posición de aminoácidos 264" indica un punto de inserción en la posición 265 o una inserción mayor, por ejemplo, de las posiciones 265 a 268, etcétera). Las anteriores realizaciones de la invención se pueden utilizar para suministrar un ácido nucleico heterólogo a una célula o sujeto como se describe aquí. Por ejemplo, el vector modificado se puede utilizar para tratar un trastorno de almacenamiento lisosómico tal como el trastorno de mucopolisacaridosis (por ejemplo, síndrome de Sly [β -glucuronidasa], síndrome de Hurler [α -L-iduronidasa], síndrome de Scheie [α -L-iduronidasa], síndrome de Hunter-Scheie [α -L-iduronidasa], síndrome de Hunter [iduronato sulfatasa], síndrome de Sanfilippo A [sulfamidasa heparan], B [N-acetilglucosaminidasa], C [acetil-CoA: α -glucosaminida acetiltransferasa], D [N-acetilglucosamina 6-sulfatasa], síndrome de Morquio A [galactosa-6-sulfato sulfatasa], B [β -galactosidasa], síndrome de Maroteaux-Lamy [N-acetilgalactosamina-4-sulfatasa], etcétera), enfermedad de Fabry (α -galactosidasa), enfermedad de Gaucher (glucocerebrosidasa) o un trastorno de almacenamiento de glucógeno (por ejemplo, enfermedad de Pompe ácido lisosómico; α -glucosidasa) como se describe aquí.

Aquellos expertos en la técnica apreciarán que para algunas proteínas cápsido AAV la modificación correspondiente será una inserción y/o una sustitución, dependiendo de si las posiciones de aminoácidos correspondientes están parcialmente o completamente presentes en el virus o, alternativamente, están completamente ausentes.

En realizaciones representativas, la inserción y/o sustitución y/o eliminación en las proteínas cápsido resulta en inserción, sustitución y/o reposicionamiento de un aminoácido que (i) mantiene la estructura de bucle hidrófilo en esa región; (ii) un aminoácido que altera la configuración de la estructura de bucle; (iii) un aminoácido cargado; y/o (iv) un aminoácido que puede ser fosforilado o sulfatado o adquiere de otra forma una carga mediante modificación postraduccional (por ejemplo, glucosilación) luego de 264 en una proteína cápsido AAV2. Aminoácidos adecuados para inserción/sustitución incluyen ácido aspártico, ácido glutámico, valina, leucina, lisina, arginina, treonina, serina, tirosina, glicina, alanina, prolina, asparagina, fenilalanina, tirosina o glutamina. En realizaciones particulares, una treonina se inserta o sustituye en una subunidad cápsido. Ejemplos no limitantes de posiciones correspondientes en un número de otros AAV se muestran en la tabla 4 (posición 2). En realizaciones particulares, la inserción de aminoácido o sustitución es una treonina, ácido aspártico, ácido glutámico, o fenilalanina (excepto que AAV que tiene una treonina, ácido glutámico o fenilalanina, respectivamente, en esta posición).

En ejemplos particulares la proteína cápsido AAV comprende una inserción del aminoácido luego de una posición de aminoácido 264 en unas proteínas cápsido AAV2, AAV3a o AAV3b o en la posición correspondiente en una proteína cápsido AAV2, AAV3a o AAV3b que se ha modificado para comprenden secuencias no AAV2, AAV3a o AAV3b, respectivamente, y/o se ha modificado mediante eliminación de uno o más aminoácidos (es decir, se deriva de AAV2, AAV3a o AAV3b). Los aminoácidos que corresponde a la posición 264 en subunidades de cápsido AAV2 (o AAV3a o AAV3b) se podrán identificar fácilmente en el virus de partida que se ha derivado del AAV2, que luego se puede modificar adicionalmente. Aminoácidos adecuados para la inserción incluyen ácido aspártico, ácido glutámico, valina, leucina, lisina, arginina, treonina, serina, tirosina, glicina, alanina, prolina, asparagina, fenilalanina, tirosina o glutamina.

En realizaciones representativas de la invención, las proteínas cápsido comprenden una treonina, ácido aspártico, ácido glutámico, o fenilalanina luego de la posición del aminoácido 264 de la proteína cápsido AAV2 (es decir, una inserción).

En otras realizaciones representativas, las proteínas cápsido modificadas o cápsidos de virus de la invención comprenden adicionalmente una o más mutaciones como se describe en WO 2007/089632 (por ejemplo, una mutación E→K en la posición de aminoácido 531 de la proteína cápsido AAV2).

En realizaciones adicionales, la proteína cápsido modificada o cápsido puede comprender una mutación como se describe en el documento WO 2009/108274.

Como otra posibilidad, la proteína cápsido AAV puede comprender una mutación como lo describe Zhong et al. (Virology 381: 194-202 (2008); Proc. Nat Acad. Sci. 105:7827-32 (2008)). Por ejemplo, la proteína cápsido AAV puede comprender una mutación Y→F en la posición de aminoácido 730.

Tabla 4

Serotipo	Posición 1	Posición 2
AAV1	A263X	T265X
AAV2	Q263X	-265X

AAV3a	Q263X	-265X
AAV3b	Q263X	-265X
AAV4	S257X	-259X
AAV5	G257X	V255X
AAV6	A263X	T265X
AAV7	E264X	A266X
AAV8	G264X	S266X
AAV9	S263X	S265X
Donde (x) → Mutación a cualquier aminoácido (-) → Inserción de cualquier aminoácido Nota: Inserciones en la posición 2 se indican mediante el sitio de inserción		

5 La invención también abarca vectores víricos que comprenden las proteínas cápsido modificado y cápsidos de la invención. En realizaciones particulares, el vector vírico es un vector de parvovirus (por ejemplo, que comprende un cápsido de parvovirus y/o genoma vector), por ejemplo, un vector AAV (por ejemplo, que comprende un AAV cápsido y/o genoma de vector). En realizaciones representativas, el vector vírico comprende un cápsido AAV modificado que comprende una subunidad de cápsido modificada de la invención y un genoma vector.

10 Por ejemplo, en realizaciones representativas, el vector vírico comprende: (a) un cápsido de virus modificado (por ejemplo, un cápsido AAV modificado) que comprende una proteína cápsido modificada de la invención; y (b) un ácido nucleico que comprende una secuencia de repetición terminal (por ejemplo, un AAV TR), en el que el ácido nucleico que comprende la secuencia de repetición terminal se encapsula mediante el cápsido del virus modificado. El ácido nucleico puede opcionalmente comprender dos repeticiones terminales (por ejemplo, dos AAV TR).

15 En realizaciones representativas, el vector vírico es un vector de virus recombinante que comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido o ARN funcional de interés. Los vectores víricos recombinantes se describen adelante en más detalle.

20 En realizaciones particulares, el vector vírico de la invención (i) tiene transducción reducida de hígado en comparación con el nivel de transducción mediante un vector vírico sin la proteína de cápsido modificado; (ii) exhibe transducción sistémica mejorada por el vector vírico en un sujeto animal en comparación con el nivel observado por un vector vírico sin la proteína cápsido modificada; (iii) demostrar movimiento mejorado a través de células endoteliales en comparación con el nivel de movimiento mediante un vector vírico sin la proteína cápsido modificado, y/o (iv) exhibir una mejora selectiva en la transducción del tejido muscular (por ejemplo, músculo esquelético, músculo cardíaco y/o músculo del diafragma), y/o (v) transducción reducida de tejidos cerebral (por ejemplo, neuronas) en comparación con el nivel de transducción mediante un vector vírico sin la proteína cápsido modificada. En realizaciones particulares, el vector vírico tiene transducción sistémica hacia el músculo, por ejemplo, transduce múltiples grupos músculos esqueléticos a través del cuerpo y opcionalmente transduce el músculo cardíaco y/o músculo de diafragma.

30 Adicionalmente, los vectores de virus modificado demuestran transducción eficiente de tejidos objetivo. En general, cuando se introduce X¹ - X² - X³ - X⁴ - X⁵ - X⁶ (SEQ ID NO: 1) en una proteína cápsido AAV, el orden de eficiencia de transducción (por ejemplo, de tejido muscular que incluye músculo esquelético, músculo cardíaco y/o músculo de diafragma) parece ser:

35 QXXTXP > NXXTXP > SXXAXP > AXXAXA

en el que la proteína cápsido modificada se incorpora en un vector vírico (por ejemplo, un vector AAV que comprende un cápsido AAV modificado que comprende la proteína cápsido AAV modificada de la invención).

40 Aquellos expertos en la técnica apreciarán que muchas modificaciones particulares se pueden desviar de esta regla general. Por ejemplo, determinados aminoácidos en las posiciones "X" pueden afectar la eficiencia de transducción. Como una ilustración, una prolina (P) en una de las posiciones "X" puede reducir la eficiencia de transducción.

45 En ejemplos particulares la transducción de músculo eficiente (esquelético, cardíaco y/o diafragma) se logra (por ejemplo, mediante un vector AAV que comprende un cápsido AAV modificado que comprende la proteína cápsido AAV modificada de la invención) cuando X¹ - X² - X³ - X⁴ - X⁵ - X⁶ (SEQ ID NO: 1) es QXXTXP o NXXTXP. En ejemplos particulares X no se selecciona de P, C y/o W.

50 Se entenderá por aquellos expertos en la técnica que las proteínas cápsido modificadas, cápsidos de virus y vectores víricos de la invención excluyen aquellas proteínas cápsido, cápsidos y vectores víricos que tienen los aminoácidos indicados en las posiciones específicas en su estado natural (es decir, no son mutantes).

Métodos de producción de vectores de virus.

- También se proporcionan métodos para producir los vectores de virus de la invención. En un ejemplo representativo, el método comprende proporcionar a una célula: (a) una plantilla de ácido nucleico que comprende por lo menos una secuencia TR (por ejemplo, secuencia TR AAV), y (b) secuencias AAV suficientes para replicación de la plantilla de ácido nucleico y encapsidación en cápsidas de AAV (por ejemplo, secuencias de rep de AAV y secuencias cap de AAV que codifican las cápsidas de AAV de la invención). Opcionalmente, la plantilla de ácido nucleico comprende adicionalmente por lo menos una secuencia de ácido nucleico heteróloga. En ejemplos particulares, la plantilla de ácido nucleico comprende dos secuencias ITR de AAV, que se encuentran 5' y 3' a la secuencia de ácido nucleico heteróloga (si está presente), aunque no tienen por qué ser directamente contiguas a la misma.
- 5 Las plantillas de ácido y secuencias rep y cap de AAV se proporcionan en condiciones tales que se produce el vector de virus que comprende la plantilla de ácido nucleico empaquetado dentro de la cápsida de AAV en la célula. El método puede comprender adicionalmente la etapa de recolectar el vector de virus de célula. El vector de virus se puede recolectar a partir del medio y/o por lisis de células.
- 10 La célula puede ser una célula que es permisiva para la replicación viral de AAV. Se puede emplear cualquier célula adecuada conocida en la técnica. En ejemplos particulares, la célula es una célula de mamífero. Como otra opción, la célula puede ser una estirpe celular de transempaquetamiento que proporciona funciones eliminadas de un virus auxiliar defectuoso de replicación, por ejemplo, células 293 u otras células de transcomplementación E1a.
- 15 La replicación de AAV y secuencias de cápsida se puede proporcionar por cualquier método conocido en la técnica. Los protocolos actuales normalmente expresan los genes rep/cap de AAV en un solo plásmido. Las secuencias de replicación y empaquetamiento de AAV no tienen que siempre estar juntas, aunque puede ser conveniente hacerlo. Las secuencias rep y/o cap de AAV se pueden proporcionar por cualquier vector viral o no viral. Por ejemplo, se pueden proporcionar secuencias de rep/cap por un virus de adenovirus o herpesvirus híbrido (por ejemplo, insertado en las regiones E1a o E3 de un vector de adenovirus suprimido). Los vectores de EBV también se pueden emplear para expresar los genes rep y cap de AAV. Una ventaja de este método es que los vectores EBV son episomales, pero mantendrán un alto número de copias a lo largo de divisiones celulares sucesivas (es decir, están integrados de manera estable en la célula como elementos extra-cromosómicos, designado como un "episoma nuclear con base en EBV", véase Margolski, (1992) Curr. Top. Microbiol. Immun. 158:67).
- 20 Como una alternativa adicional, las secuencias de rep/cap se pueden incorporar de forma estable en una célula. Normalmente, las secuencias de rep/cap de AAV no serán flanqueadas por los TRs, para evitar rescate y/o empaquetamiento de estas secuencias.
- 25 Se puede proporcionar la plantilla de ácido nucleico a la célula utilizando cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, se puede suministrar la plantilla por un vector no viral (por ejemplo, plásmido) o viral. En ejemplos particulares, la plantilla de ácido nucleico se suministra por un vector de herpesvirus o adenovirus (por ejemplo, insertado en las regiones E1a o E3 de un adenovirus suprimido). Como otra ilustración, Palombo et al., (1998) J. Virology 72:5025, describe un vector de baculovirus que porta un gen reportero flanqueado por los TRs de AAV. También se pueden emplear vectores de EBV para suministrar la plantilla, como se describió anteriormente con respecto a los genes rep/cap.
- 30 En otro ejemplo representativo, se proporciona la plantilla de ácido nucleico mediante un virus de replicación rAAV. En todavía otras realizaciones, un provirus AAV que comprende la plantilla de ácido nucleico se integra de forma estable en el cromosoma de la célula.
- 35 Para mejorar los títulos de virus, las funciones de virus auxiliar (por ejemplo, adenovirus o herpesvirus) que promueven una infección de AAV productiva se puede proporcionar a la célula. Secuencias de virus auxiliar necesarias para la replicación AAV son conocidos en la técnica. Normalmente, estas secuencias se proporcionarán por un adenovirus auxiliar o vector herpesvirus. Alternativamente, se pueden proporcionar las secuencias de adenovirus o virus del herpes por otro vector no viral o viral, por ejemplo, como un miniplásmido de adenovirus no infeccioso que transporta todos los genes auxiliares que promueven la producción de AAV eficiente como se describe por Ferrari et al., (1997) Nature Med. 3: 1295, y la Patente de Estados Unidos Nos. 6,040,183 y 6,093,570.
- 40 Adicionalmente, las funciones del virus auxiliar se pueden proporcionar por una célula de empaquetamiento con las secuencias auxiliares incorporadas en el cromosoma o preservadas como un elemento extracromosómico estable. Generalmente, las secuencias de virus auxiliar no se pueden empaquetar en viriones de AAV, por ejemplo, no están flanqueados por TRs.
- 45 Aquellos expertos en la técnica apreciarán que puede ser ventajoso proporcionar la replicación de AAV y secuencias de cápsida y las secuencias de virus auxiliar (por ejemplo, secuencias de adenovirus) en una sola construcción auxiliar. Esta construcción auxiliar puede ser una construcción no viral o viral. Como una ilustración no limitante, la construcción auxiliar puede ser un herpesvirus híbrido o adenovirus híbrido que comprende los genes rep/cap de AAV.
- 50 En un ejemplo particular, las secuencias de rep/cap de AAV y las secuencias de adenovirus auxiliares se suministran por un único vector de adenovirus auxiliar. Este vector puede adicionalmente comprender adicionalmente la plantilla de ácido
- 55
- 60
- 65

nucleico. Las secuencias de rep de AAV/cap y/o la plantilla de rAAV se pueden insertar en una región eliminada (por ejemplo, las regiones E1 o E3) del adenovirus.

5 En un ejemplo adicional, las secuencias de rep/cap de AAV y las secuencias de adenovirus auxiliares se suministran por un único vector de adenovirus auxiliar. De acuerdo con este ejemplo, la plantilla de rAAV se puede proporcionar como una plantilla de plásmido.

10 En otro ejemplo ilustrativo, las secuencias de rep/cap de AAV y secuencias de adenovirus auxiliares están dentro por un único vector de adenovirus auxiliar, y la plantilla de rAAV está integrada en la célula como un provirus. Alternativamente, la plantilla de rAAV se proporciona mediante un vector de EBV que se mantiene dentro de la célula como un elemento extracromosómico (por ejemplo, como un episoma nuclear a base de EBV).

15 En un ejemplo adicional a modo de ejemplo, las secuencias rep/cap de AAV y secuencias de adenovirus auxiliares se proporcionan por un solo adenovirus auxiliar. La plantilla de rAAV se puede proporcionar como un vector viral de replicación separados. Por ejemplo, la plantilla de rAAV se puede proporcionar por una partícula de rAAV o una segunda partícula de adenovirus recombinante.

20 De acuerdo con los métodos precedentes, el vector de adenovirus híbrido normalmente comprende secuencias cis del adenovirus 5' y 3' suficientes para la replicación del adenovirus y el empaquetamiento (es decir, las repeticiones terminales de adenovirus y la secuencia de PAC). Las secuencias de rep/cap de AAV y, si está presente, la plantilla de rAAV se incorpora en la cadena principal de adenovirus y están flanqueadas por cis de extremos 5' y 3', de tal manera que estas secuencias se pueden empaquetar en cápsidas de adenovirus. Como se describió anteriormente, las secuencias auxiliares de adenovirus y las secuencias de rep/cap de AAV son generalmente no flanqueadas por TRs de tal manera que estas secuencias no se empaquetan en los viriones de AAV.

25 Zhang et al., ((2001) Gene Ther. 18: 704-12) describen un auxiliar quimérico que comprende adenovirus y los genes rep y cap de AAV.

30 El herpesvirus también se puede utilizar como un virus auxiliar en los métodos de empaquetamiento de AAV. El herpesvirus híbrido que codifica la proteína(s) de rep de AAV puede facilitar de forma ventajosa esquemas de producción del vector AAV escalables. Se ha descrito un vector de virus herpes simplex híbrido tipo I (HSV-1) que expresa los genes rep y cap de AAV-2 (Conway et al., (1999) Gene Therapy 6: 986 y WO 00/17377.

35 Como una alternativa adicional, los vectores de virus de la invención se pueden producir en células de insecto utilizando vectores de baculovirus para suministrar los genes rep/cap y la plantilla de rAAV como se describe, por ejemplo, por Urabe et al., (2002) Human gene Therapy 13: 1935- 43.

40 Se pueden obtener soluciones madre de vector AAV libres de virus auxiliar contaminante por cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, el virus AAV y auxiliar se pueden diferenciar fácilmente en base al tamaño. El AAV también se puede separar de los virus auxiliares con base en la afinidad para un sustrato de heparina (Zolotukhin et al. (1999) Gene Therapy 6:973). Se pueden utilizar virus auxiliares defectuosos con replicación eliminada de tal manera que cualquier virus auxiliar contaminante no es competente de la replicación. Como una alternativa adicional, se puede emplear un adenovirus auxiliar que carece de expresión de genes tardíos, ya que sólo la expresión de gen de adenovirus temprano se requiere para mediar el empaquetamiento del virus AAV. Los mutantes de adenovirus defectuosos para la expresión de genes tardíos son conocidos en la técnica (por ejemplo, mutantes de adenovirus ts100K y ts149).

Vectores de virus recombinantes.

50 Los vectores de virus de la presente invención son útiles para el suministro de ácidos nucleicos a células in vitro, ex vivo, e in vivo. En particular, los vectores de virus se pueden emplear ventajosamente para suministrar o transferir ácidos nucleicos a animales, que incluyen mamíferos, células.

55 Cualquier secuencia heteróloga de ácido nucleico(s) de interés se puede suministrar en los vectores de virus de la presente invención. Los ácidos nucleicos de interés incluyen ácidos nucleicos que codifican polipéptidos, que incluyen polipéptidos terapéuticos (por ejemplo, para usos médicos o veterinarios) o inmunogénicos (por ejemplo, para vacunas).

60 Los polipéptidos terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, proteína reguladora de la membrana de fibrosis quística (CFTR), la distrofina (que incluye mini y micro-distrofinas, véase, por ejemplo, Vincent et al., (1993) Nature Genetics 5: 130; Patente de Estados Unidos No. 2003/017131; publicación internacional WO/2008/088895, Wang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:13714-13719 (2000); and Gregorevic et al., Mol. Ther. 16:657-64 (2008)), propéptido de miostatina, folistatina, receptor soluble tipo II de activina, IGF-1, polipéptidos anti-inflamatorios tales como el mutante Ikappa B dominante, sarcospan, la utrofina Nature (Tinsley et al., (1996). 384: 349), mini-utrofina, factores de coagulación (por ejemplo, Factor VIII, Factor IX, Factor X, etc.), eritropoyetina, angiostatina, endostatina, catalasa, tirosina hidroxilasa, superóxido dismutasa, leptina, el receptor LDL, lipoproteína lipasa, ornitina transcarbamilasa, β -globina, α -globina, espectrina, α_1 -antitripsina, adenosina desaminasa, hipoxantina guanina fosforibosil transferasa, β -glucocerebrosidase, esfingomielinasa, hexosaminidasa A lisosomal, deshidrogenasa del ácido ceto de cadena ramificada, proteína RP65,

5 citoquinas (por ejemplo, α -interferón, β -interferón, y interferón, interleucina-2, interleucina-4, factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos, linfotoxina, y similares), factores de crecimiento de péptidos, factores neurotróficos y hormonas (por ejemplo, somatotropina, insulina, factores 1 y 2 de crecimiento similares a insulina, 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 del hueso [que incluyen RANKL y VEGF], factor de crecimiento derivado de la glía, factor de crecimiento transformante - α y - β , y similares), ácido α -glucosidasa lisosomal, α -galactosidasa A, receptores (por ejemplo, receptor soluble del factor de crecimiento de necrosis tumoral α), S100A1, parvalbúmina, adenilil ciclasa tipo 6, una molécula que modula la manipulación de calcio (por ejemplo, SERCA_{2a}, el inhibidor 1 de PP1 y fragmentos del mismo [por ejemplo, los documentos WO 2006/029319 y WO 2007/100465]), una molécula que afecta la atenuación tipo de de la quinasa receptora acoplado a proteína G tal como un bARKct constitutivamente activo truncado, los factores anti-inflamatorios tales como IRAP, proteínas anti-miostatina, aspartoacilasa, anticuerpos monoclonales (que incluyen solo anticuerpos monoclonales de cadena; un Mab de ejemplo es el Herceptin® Mab), neuropéptidos y fragmentos de los mismos (por ejemplo, galanina, neuropéptido Y (véase, U.S. 7,071,172), inhibidores de angiogénesis tales como Vasohibinas y otros inhibidores de VEGF (por ejemplo, Vasohibin 2 [véase, documento WO JP2006/073052]). Otras secuencias de ácidos nucleicos heterólogas ilustrativas codifican productos de genes suicidas (por ejemplo, timidina quinasa, citosina desaminasa, toxina de difteria, y factor de necrosis tumoral), proteínas que confieren resistencia a un fármaco utilizado en la terapia del cáncer, productos de genes supresores de tumor (por ejemplo, p53, Rb, WT-1), TRAIL, FAS-ligando, y cualquier otro polipéptido que tenga un efecto terapéutico en un sujeto en necesidad del mismo. Los vectores de AAV también se pueden utilizar para suministrar anticuerpos monoclonales y fragmentos de anticuerpos, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo dirigido contra la miostatina (véase, por ejemplo, Fang et al., Nature Biotechnology 23:584-590 (2005)).

25 Las secuencias de ácido nucleico heterólogas que codifican polipéptidos incluyen aquellos que codifican polipéptidos reporteros (por ejemplo, una enzima) los polipéptidos reporteros se conocen en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, proteína verde fluorescente, β -galactosidasa, fosfatasa alcalina, luciferasa, y el gen de cloranfenicol acetiltransferasa.

Opcionalmente, el ácido nucleico heterólogo codifica un polipéptido secretado (por ejemplo, un polipéptido que es un polipéptido secretado en su estado nativo o que ha sido diseñado para ser secretado, por ejemplo, por asociación operable con una secuencia de señal secretora tal como se conoce en la técnica).

30 Alternativamente, en realizaciones particulares de esta invención, el ácido nucleico heterólogo puede codificar un ácido nucleico antisentido, una ribozima (por ejemplo, como se describe en la Patente de Estados Unidos No. 5,877,022), ARN que efectúa trans-corte y empalme mediado por espliceosoma (véase, Puttaraju et al., (1999) Nature Biotech. 17:246; patente de Estados Unidos No. 6,013,487; patente de Estados Unidos No. 6,083,702), ARN de interferencia (iARN), que incluye siARN, shARN o miARN que median el silenciamiento génico (véase Sharp et al., (2000) Science 287: 2431) y otros ARN no traducidos, como ARN "guía" (Gorman et al., (1998) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 95:4929; patente de Estados Unidos No. 5,869,248 otorgada a Yuan et al.), y similares. Los ARNs no traducidos de ejemplo incluyen iARN contra un producto de gen de resistencia a múltiples fármacos (MDR) (por ejemplo, para tratar y/o prevenir tumores y/o para administración al corazón para evitar daños mediante quimioterapia), el iARN contra la miostatina (por ejemplo, para distrofia muscular de Duchenne), el iARN contra VEGF (por ejemplo, para tratar y/o prevenir tumores), el iARN contra fosfolamban (por ejemplo, para tratar la enfermedad cardiovascular, véase, por ejemplo, Andino et al., J. Gene Med. 10:132-142 (2008) and Li et al., Acta Pharmacol Sin. 26:51-55 (2005)); moléculas dominantes-negativas o inhibidoras de fosfolamban tales como fosfolamban S16E (por ejemplo, para tratar enfermedad cardiovascular, véase, por ejemplo, Hoshijima et al. Nat. Med. 8:864-871 (2002)), iARN para adenosina quinasa (por ejemplo, para epilepsia), y iARN dirigido contra organismos y virus patógenos (por ejemplo, hepatitis B y/o C, virus de inmunodeficiencia humana, CMV, virus del herpes simple, virus del papiloma humano, etc.).

50 Adicionalmente, se puede suministrar una secuencia de ácido nucleico que dirige corte y empalme alternativo. Para ilustrar, una secuencia antisentido (u otra secuencia inhibidora) complementaria al sitio de corte y empalme 5' y/o 3' del exón de distrofina 51 se puede suministrar en conjunto con un promotor de ARN U1 o U7 pequeño nuclear (sn) para inducir omisión de este exón. Por ejemplo, una secuencia de ADN que comprende un promotor de snARN U1 o U7 situado en 5' de la secuencia antisentido/inhibidora(s) se puede empaquetar y suministrar en una cápsida modificada de la invención.

55 El vector de virus también puede comprender un ácido nucleico heterólogo que comparte homología con y se recombina con un locus en un cromosoma del anfitrión. Este método se puede utilizar, por ejemplo, para corregir un defecto genético en la célula anfitriona.

60 La presente invención también proporciona vectores de virus que expresan un polipéptido inmunogénico, por ejemplo, para vacunación. El ácido nucleico puede codificar cualquier inmunógeno de interés conocido en la técnica que incluye, pero no se limita a, inmunógenos del virus de inmunodeficiencia humana (VIH), virus de inmunodeficiencia en simios (SIV), virus de la gripe, VIH o proteínas gag de SIV, antígenos tumorales, antígenos de cáncer, antígenos bacterianos, antígenos virales, y similares.

65 El uso de parvovirus como vectores de vacunas se conoce en la técnica (véase, por ejemplo, Miyamura et al., (1994) Proc. Nat. Acad. Sci USA 91:8507; Patente de Estados Unidos No. 5,916,563 otorgada a Young et al., Patente de Estados

Unidos No. 5,905,040 otorgada a Mazzara et al., Patente de Estados Unidos No. 5,882,652, Patente de Estados Unidos No. 5,863,541 otorgada a Samulski et al.). El antígeno se puede presentar en la cápsida de parvovirus. Alternativamente, el antígeno se puede expresar a partir de un ácido nucleico heterólogo introducido en un genoma vector recombinante. Cualquier inmunógeno de interés como se describe aquí y/o como se conoce en la técnica se puede proporcionar por el vector de virus de la presente invención.

Un polipéptido inmunogénico puede ser cualquier polipéptido adecuado para provocar una respuesta inmunitaria y/o protección del sujeto contra una infección y/o enfermedad, que incluye, pero no limita a, infecciones y enfermedades microbianas, bacterianas, por protozoos, por parásitos, hongos y/o virales. Por ejemplo, el polipéptido inmunogénico puede ser un inmunógeno de ortomixovirus (por ejemplo, un inmunógeno del virus de la gripe, tal como la proteína de superficie de hemaglutinina del virus de influenza (HA) o la nucleoproteína del virus de la influenza, o un inmunógeno del virus de la gripe equina) o un inmunógeno de lentivirus (por ejemplo, un inmunógeno del virus de anemia infecciosa en equinos, un inmunógeno de virus de inmunodeficiencia de simio (SIV), o un inmunógeno de virus de inmunodeficiencia humano (VIH), tales como el VIH o la proteína GP160 de envoltura de SIV, el VIH o proteínas de la matriz/cápsida de SIV y el VIH o SIV gag, productos de genes pol y env). El polipéptido inmunogénico también puede ser un inmunógeno de arenavirus (por ejemplo, inmunógeno del virus de fiebre Lassa, tal como la proteína de nucleocápsida del virus de fiebre Lassa y la glicoproteína de la envoltura de fiebre Lassa), un inmunógeno de poxvirus (por ejemplo, un inmunógeno del virus de vaccinia, tal como productos de genes de vaccinia L1 o L8), un inmunógeno de flavivirus (por ejemplo, un inmunógeno amarillo del virus de la fiebre o un inmunógeno del virus de la encefalitis japonesa), un inmunógeno de filovirus (por ejemplo, un inmunógeno del virus Ebola, o un inmunógeno del virus de Marburg, tal como productos de gen NP y GP), un inmunógeno de bunyavirus (por ejemplo, inmunógenos de virus RVFV, CCHF, y/o SFS), o un inmunógeno de coronavirus (por ejemplo, un inmunógeno coronavirus humano de enfermedad infecciosa, tal como la glicoproteína de envoltura de coronavirus humana, o un inmunógeno del virus de la gastroenteritis transmisible porcina, o un inmunógeno del virus de bronquitis aviar infecciosa). El polipéptido inmunogénico puede ser adicionalmente un inmunógeno de la polio, un inmunógeno de herpes (por ejemplo, inmunógenos CMV, EBV, HSV) un inmunógeno de las paperas, un inmunógeno de sarampión, un inmunógeno de rubéola, una toxina de difteria u otro inmunógeno de difteria, un antígeno de la tos ferina, un inmunógeno de hepatitis (por ejemplo, hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, etc.), y/o cualquier otro inmunógeno de vacuna conocido ahora en la técnica o identificado más tarde como un inmunógeno.

Alternativamente, el polipéptido inmunogénico puede ser cualquier antígeno de célula de tumor o cáncer. Opcionalmente, el antígeno tumoral o cáncer se expresa en la superficie de la célula cancerosa. Los antígenos de células del cáncer y tumorales a modo de ejemplo se describen en S.A. Rosenberg (Immunity 10:281 (1991)). Otros antígenos de cáncer y tumorales ilustrativos incluyen, pero no se limitan a: producto gen BRCA1, producto de gen BRCA2, gp100, tirosinasa, GAGE-1/2, BAGE, RAGE, LAGE, NY-ESO-1, CDK-4, β -catenina, MUM-1, Caspasa-8, KIAA0205, HPVE, SART-1, PRAME, p15, antígenos tumorales de melanoma (Kawakami et al., (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3515; Kawakami et al., (1994) J. Exp. Med., 180:347; Kawakami et al., (1994) Cancer Res. 54:3124), MART-1, gp100 MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, CEA, TRP-1, TRP-2, P-15, tirosinasa (Brichard et al., (1993) J. Exp. Med. 178:489); producto de gen HER-2/neu (Patente Estados Unidos No. 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 estrógeno, globulina de grasa de leche, proteína supresora de tumor p53 (Levine, (1993) Ann. Rev. Biochem. 62: 623); antígenos de mucina (Publicación de Patente Internacional No. WO 90/05142); telomerasas; proteínas de matriz nuclear; fosfatasa ácida prostática; antígenos del virus del papiloma; y/o antígenos conocidos ahora o descubiertos más tarde que se asocian con los siguientes cánceres: melanoma, adenocarcinoma, timoma, linfoma (por ejemplo, linfoma no Hodgkin, linfoma de Hodgkin), sarcoma, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de colon, leucemia, cáncer uterino, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer cervical, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de páncreas, cáncer de cerebro y cualquier otra afección de cáncer o maligno conocido ahora o identificado más tarde (véase, por ejemplo, Rosenberg, (1996) Ann. Rev. Med. 47: 481-91).

Como una alternativa adicional, el ácido nucleico heterólogo puede codificar cualquier polipéptido que se produce de forma deseable en una célula in vitro, ex vivo, o in vivo. Por ejemplo, los vectores de virus se pueden introducir en células cultivadas y el producto de gen expresado aislado del mismo.

Se entenderá por los expertos en la técnica que el ácido nucleico heterólogo(s) de interés se puede asociar de forma operativa con secuencias de control apropiadas. Por ejemplo, el ácido nucleico heterólogo se puede asociar operativamente con los elementos de control de expresión, tales como señales de control de transcripción/traducción, orígenes de replicación, señales de poliadenilación, sitios de entrada de ribosoma interno (IRES), promotores y/o potenciadores, y similares.

Adicionalmente, la expresión regulada del ácido nucleico heterólogo(s) de interés se puede conseguir a nivel postranscripcional, por ejemplo, al regular el empalme y corte selectivo de diferentes intrones por la presencia o ausencia de un oligonucleótido, molécula pequeña y/u otro compuesto actividad que bloquea selectivamente el empalme y corte en sitios específicos (por ejemplo, como se describe en el documento WO 2006/119137).

Aquellos expertos en la técnica apreciarán que se puede utilizar una variedad de elementos promotores/potenciadores dependiendo del nivel y expresión específica a tejido deseada. El promotor/potenciador puede ser constitutivo o inducible, dependiendo del patrón de expresión deseado. El promotor/potenciador puede ser nativo o extraño y puede ser una

secuencia natural o sintética. Por extraño, se pretende que la región de iniciación transcripcional no se encuentre en el anfitrión de tipo natural en la que se introduce la región de iniciación transcripcional.

En realizaciones particulares, los elementos promotores/potenciadores puede ser nativos a la célula objetivo o sujeto que se va a tratar. En realizaciones representativas, los elementos promotores/potenciadores pueden ser nativos de la secuencia de ácido nucleico heterólogo. El elemento promotor/potenciador se elige generalmente de tal manera que funcione en la célula(s) objetivo de interés. Adicionalmente, en realizaciones particulares el elemento promotor/potenciador es un elemento promotor/potenciador de mamífero. El elemento promotor/potenciador puede ser constitutivo o inducible.

Los elementos de control de expresión inducibles son normalmente ventajosos en aquellas aplicaciones en las que es deseable proporcionar regulación sobre la expresión de la secuencia de ácido nucleico heterólogo(s). Los promotores inducibles/elementos potenciadores para el suministro de genes pueden ser específico a tejido o elementos promotores/potenciadores preferidos, e incluyen elementos de promotor/potenciador específico o preferido a músculo (que incluyen específico o preferido a músculo cardíaco, esquelético y/o liso), específico o preferido a tejido neural (que incluye específico o preferido a cerebro), específico o preferido a ojo (que incluye específico a retina y específico a córnea), específico o preferido a hígado, específico o preferido a médula ósea, específico o preferido a pancreático, específico o preferido a bazo y específico o preferido pulmonar. Otros elementos promotores/potenciadores inducibles incluyen hormona inducible y elementos de metal inducible. Los elementos promotores/potenciadores inducibles de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, un elemento Tet on/off, un promotor inducible por RU486, un promotor inducible por ecdisona, un promotor inducible por rapamicina y un promotor de metalotioneína.

En realizaciones en las que la secuencia de ácido nucleico heteróloga(s) se transcribe y luego se traduce en las células objetivo, señales de iniciación específica se incluyen generalmente para la traducción eficaz de secuencias de codificación de proteína insertada. Estas secuencias de control de traducción exógenas, pueden incluir el codón de iniciación ATG y secuencias adyacentes, pueden tener una variedad de orígenes, tanto naturales como sintéticos.

Los vectores de virus de acuerdo con la presente invención proporcionan un medio para suministrar ácidos nucleicos heterólogos en un amplio rango de células, que incluyen células que se dividen y que no se dividen. Los vectores de virus se pueden emplear para suministrar un ácido nucleico de interés a una célula in vitro, por ejemplo, para producir un polipéptido in vitro o para terapia génica ex vivo. Los vectores de virus son adicionalmente útiles en un método para suministrar un ácido nucleico a un sujeto en necesidad del mismo, por ejemplo, para expresar un polipéptido inmunogénico o terapéutico o un ARN funcional. De esta manera, el polipéptido o ARN funcional pueden ser producidos in vivo en el sujeto. El sujeto puede estar en necesidad del polipéptido porque el sujeto tiene una deficiencia del polipéptido. Adicionalmente, el método se puede practicar porque la producción del polipéptido o ARN funcional en el sujeto puede impartir algún efecto beneficioso.

También se pueden utilizar vectores de virus para producir un polipéptido de interés o ARN funcional en células cultivadas o en un sujeto (por ejemplo, utilizando el sujeto como un biorreactor para producir el polipéptido o para observar los efectos de la ARN funcional sobre el sujeto, por ejemplo, en relación con los métodos de cribado).

En general, se pueden emplear vectores de virus de la presente invención para suministrar un ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido o ARN funcional para tratar y/o prevenir cualquier estado de enfermedad para el cual es beneficioso suministrar un polipéptido terapéutico o ARN funcional. Los estados de enfermedad ilustrativos incluyen, pero no se limitan a: fibrosis quística (proteína de transmembrana reguladora de fibrosis quística) y otras enfermedades del pulmón, hemofilia A (Factor VIII), hemofilia B (factor IX), talasemia (β -globina), anemia (eritropoyetina) y otros trastornos de la sangre, enfermedad de Alzheimer (GDF; neprilisin), esclerosis múltiple (β -interferón), enfermedad de Parkinson (estirpe de células gliales derivadas de factor neurotrófico [GDNF]), enfermedad de Huntington (iARN para eliminar repeticiones), esclerosis lateral amiotrófica, epilepsia (galanina, factores neurotróficos), y otros trastornos neurológicos, cáncer (endostatina, angiostatina, TRAIL, ligando FAS, citoquinas que incluyen interferones; iARN que incluye iARN contra VEGF o el producto de gen de resistencia a múltiples fármacos, mir-26a [por ejemplo, para carcinoma hepatocelular]), diabetes mellitus (insulina), distrofias musculares que incluyen Duchenne (distrofina, mini-distrofina, factor I de crecimiento similar a insulina un sarcoglicano [por ejemplo, α , β , γ], el iARN contra miostatina, propéptido de miostatina, follistatina, receptor soluble de activina tipo II, polipéptidos antiinflamatorios tales como el mutante dominante B κ , sarcospan, la utrofina, mini-utrofina, antisentido o iARN contra uniones de empalme en el gen de distrofina para inducir omisión de exón [véase, por ejemplo, WO/2003/095647], antisentido contra U7 ARNs para inducir omisión de exón [véase, por ejemplo, WO/2006/021724], y anticuerpos o fragmentos de anticuerpos contra miostatina o propéptido de miostatina) y enfermedad de Becker, Gaucher (glucocerebrosidasa), enfermedad de Hurler (α -L-iduronidasa), deficiencia de adenosina desaminasa (adenosina desaminasa), enfermedades de almacenamiento de glucógeno (por ejemplo, enfermedad de Fabry [α -galactosidasa] y enfermedad de Pompe [ácido α -glucosidasa lisosomal]) y otros trastornos metabólicos, enfisema congénito (α 1-antitripsina), Síndrome de Lesch-Nyhan (hipoxantina guanina fosforribosil transferasa), enfermedad de Niemann-Pick (esfingomielinasa), enfermedad de Tays Sachs (hexosaminidasa A lisosomal), enfermedad de orina de jarabe de arce (ceto ácido deshidrogenasa de cadena ramificada), enfermedades degenerativas retinales (y otras enfermedades del ojo y retina; por ejemplo, PDGF para degeneración macular y/o vasohibin u otros inhibidores de VEGF u otros inhibidores de la angiogénesis para tratar/prevenir trastornos de la retina, por ejemplo, en la diabetes tipo I), enfermedades de órganos sólidos tales como el cerebro (que incluyen enfermedad de Parkinson [GDNF],

astrocitomas [endostatina, angiostatina y/o iARN contra VEGF], glioblastomas [endostatina, angiostatina y/o iARN contra VEGF]), hígado, riñón, corazón, incluyendo insuficiencia cardíaca congestiva o enfermedad arterial periférica (PAD) (por ejemplo, al suministrar inhibidor de la proteína fosfatasa 1 (I-1) y fragmentos de los mismos (por ejemplo, 11C), serca2a, proteínas con dedos de zinc que regulan el gen fosfolamban, Barkct, receptor β 2-adrenérgico, quinasa del receptor β 2-adrenérgico (BARK), fosfoinosítido 3 quinasa (PI3 quinasa), S100A1, parvalbúmina, adenilil ciclasa tipo 6, una molécula que afecta la atenuación de la proteína G acoplada al receptor quinasa tipo 2 tal como una bARKct activa constitutivamente truncada; cal sarcina, iARN contra fosfolamban; inhibidor de fosfolamban o moléculas dominantes negativas tales como fosfolamban S16E, etc.), artritis (factores de crecimiento similares a insulina), trastornos de articulación (factor de crecimiento similar a insulina 1 y/o 2), hiperplasia íntima (por ejemplo, al suministrar enos, inos), mejora de la supervivencia de trasplantes de corazón (superóxido dismutasa), SIDA (CD4 soluble), desgaste muscular (factor de crecimiento similar a insulina I), deficiencia renal (eritropoyetina), anemia (eritropoyetina), artritis (factores anti-inflamatorios tales como receptor soluble IRAP y TNF α), hepatitis (α -interferón), deficiencia del receptor de LDL (receptor de LDL), hiperamonemia (ornitina transcarbamilasa), enfermedad de Krabbe (galactocerebrosidasa), enfermedad de Batten, ataxias cerebrales espinales que incluyen SCA1, SCA2 y SCA3, fenilcetonuria (fenilalanina hidroxilasa), enfermedades autoinmunes, y similares. La invención adicionalmente se puede utilizar después de un trasplante de órganos para aumentar el éxito del trasplante y/o para reducir los efectos secundarios negativos del trasplante de órganos o terapias adjuntas (por ejemplo, mediante al administrar agentes inmunosupresores o ácidos nucleicos inhibidores para bloquear la producción de citoquinas). Como otro ejemplo, se pueden administrar proteínas morfogénicas del hueso (que incluyen BNP 2, 7, etc., RANKL y/o VEGF) con un aloinjerto de hueso, por ejemplo, después de una rotura o extirpación quirúrgica en un paciente con cáncer.

La invención también se puede utilizar para producir citoblastos pluripotentes inducidos (iPS). Por ejemplo, un vector de virus de la invención se puede utilizar para suministrar ácido nucleico asociado con citoblastos(s) en una célula no pluripotente, tales como fibroblastos adultos, células de piel, células hepáticas, células renales, células adiposas, células cardíacas, células neurales, células epiteliales, células endoteliales, y similares. Los factores que codifican ácidos nucleicos asociados con citoblastos se conocen en la técnica. Ejemplos no limitantes de dichos factores asociados con citoblastos y pluripotencia incluyen la familia SOX Oct-3/4, (por ejemplo, SOX1, SOX2, SOX3 y/o SOX15), la familia Klf (por ejemplo, Klf1, Klf2, Klf4 y/o Klf5), la familia myc (por ejemplo, C-myc, L-myc y/o N-myc), NANOG y/o LIN28.

La invención también se puede utilizar para tratar y/o prevenir un trastorno metabólico tal como diabetes (por ejemplo, insulina), hemofilia (por ejemplo, Factor IX o Factor VIII), un trastorno de almacenamiento lisosómico, tal como un trastorno de mucopolisacaridosis (por ejemplo, síndrome de Sly [β -glucuronidasa], síndrome de Hurler [α -L-iduronidasa], síndrome de Scheie [α -L-iduronidasa], síndrome de Hurler-Scheie [α -L-iduronidasa], síndrome de Hunter [iduronato sulfatasa], síndrome de Sanfilippo A [sulfamidasa heparán], B [N-acetilglucosaminidasa], C [acetil-CoA: α -glucosaminidasa acetiltransferasa], D [N-acetilglucosamina 6-sulfatasa], Síndrome de Morquio A [sulfatasa galactosa-6-sulfato], B [β -galactosidasa], síndrome Maroteaux-Lamy [N-acetilgalactosamina-4-sulfatasa], etc.), enfermedad de Fabry (α -galactosidasa), enfermedad de Gaucher (glucocerebrosidasa), o un trastorno de almacenamiento de glucógeno (por ejemplo, enfermedad de Pompe; ácido α -glucosidasa lisosomal).

La transferencia de genes tiene un uso potencial sustancial para la comprensión y suministro de terapia para estados de enfermedad. Existe una serie de enfermedades hereditarias en las que se conocen genes defectuosos y han sido clonados. En general, los estados de enfermedad anteriores se dividen en dos clases: estados de deficiencia, usualmente de enzimas, que generalmente se heredan de una manera recesiva, y estados desequilibrados, que pueden implicar proteínas reguladoras o estructurales, y que por lo general se heredan de una manera dominante. Para las enfermedades de estado de deficiencia, la transferencia génica se puede utilizar para llevar un gen normal en los tejidos afectados para terapia de reemplazo, así como para crear modelos animales para la enfermedad utilizando mutaciones antisentido. Para estados de enfermedad desequilibrados, la transferencia de genes puede ser utilizada para crear un estado de enfermedad en un sistema modelo, que luego se puede utilizar en esfuerzos para contrarrestar el estado de enfermedad. Por lo tanto, los vectores de virus de acuerdo con la presente invención permiten el tratamiento y/o prevención de enfermedades genéticas.

También se pueden emplear vectores de virus de acuerdo con la presente invención para proporcionar un ARN funcional a una célula in vitro o in vivo. La expresión del ARN funcional en la célula, por ejemplo, puede disminuir la expresión de una proteína objetivo particular por la célula. De acuerdo con lo anterior, el ARN funcional se puede administrar para disminuir la expresión de una proteína particular en un sujeto en necesidad de la misma. El ARN funcional también se puede administrar a células in vitro para regular la expresión génica y/o la fisiología celular, por ejemplo, para optimizar los sistemas de cultivo celular o tisular o en métodos de cribado.

Adicionalmente, los vectores de virus de acuerdo con la presente invención encuentran uso en métodos de diagnóstico y detección, mediante el cual un ácido nucleico de interés se expresa de forma transitoria o estable en un sistema de cultivo celular, o alternativamente, un modelo de animal transgénico.

Los vectores de virus de la presente invención también se pueden utilizar para diversos fines no terapéuticos, que incluyen pero no se limitan al uso en los protocolos para evaluar la orientación del gen, la depuración, transcripción, traducción, etc., como sería evidente para un experto en la técnica. Los vectores de virus también se pueden utilizar para el propósito de evaluar la seguridad (propagación, toxicidad, inmunogenicidad, etc.). Estos datos, por ejemplo, son considerados por

la Administración de Fármacos y Alimentos como parte del proceso de aprobación regulatoria antes de la evaluación de la eficacia clínica.

5 Como un aspecto adicional, los vectores de virus de la presente invención se pueden utilizar para producir una respuesta inmunitaria en un sujeto. Un vector de virus que comprende una secuencia de ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido inmunogénico se puede administrar a un sujeto, y una respuesta inmunitaria activa se monta por el sujeto contra el polipéptido inmunogénico. Los polipéptidos inmunogénicos son como se describieron anteriormente aquí. En algunos ejemplos se provoca una respuesta inmunitaria protectora.

10 Alternativamente, el vector de virus se puede administrar a una célula ex vivo y la célula alterada se administra al sujeto. El vector de virus que comprende el ácido nucleico heterólogo se introduce en la célula, y la célula se administra al sujeto, en la que el ácido nucleico heterólogo que codifica el inmunógeno se puede expresar e inducir una respuesta inmunitaria en el sujeto contra el inmunógeno. En ejemplos particulares, la célula es una célula que presenta antígeno (por ejemplo, una célula dendrítica).

15 Una "respuesta inmunitaria activa" o "inmunidad activa" se caracteriza por la "participación de tejidos y células del anfitrión después de un encuentro con el inmunógeno. Se implica diferenciación y proliferación de células inmunocompetentes en tejidos linforreticulares, que conducen a la síntesis de anticuerpo o el desarrollo de reactividad mediada por células, o ambos". Herbert B. Herscovitz, Immunophysiology: Cell Function and Cellular Interactions in Antibody Formation, in IMMUNOLOGY: BASIC PROCESSES 117 (Joseph A. Bellanti ed., 1985). Alternativamente, una respuesta inmunitaria activa se monta por el anfitrión después de exposición a un inmunógeno por infección o por vacunación. La inmunidad activa se puede contrastar con la inmunidad pasiva, que se adquiere a través de la "transferencia de sustancias preformadas (anticuerpo, factor de transferencia, injerto tímico, interleucina-2) de un anfitrión inmunizado activamente a un anfitrión no inmunitario". Id.

25 Una respuesta inmunitaria "protectora" o inmunidad "protectora", como se utiliza aquí indica que la respuesta inmunitaria confiere algún beneficio al sujeto en que se evita o reduce la incidencia de la enfermedad. Alternativamente, una respuesta inmunitaria protectora o inmunidad protectora pueden ser útiles en el tratamiento y/o prevención de enfermedades, en cáncer o tumores particulares (por ejemplo, al evitar la formación de cáncer o tumores, al provocar la regresión de un cáncer o tumor y/o al prevenir metástasis y/o al prevenir el crecimiento de nódulos metastásicos). Los efectos protectores pueden ser completos o parciales, siempre que los beneficios del tratamiento superen cualquier desventajas de los mismos. El vector de virus o célula que comprende el ácido nucleico heterólogo se puede administrar en una cantidad inmunogénicamente efectiva, como se describe a continuación.

35 Los vectores de virus de la presente invención también se pueden utilizar para la inmunoterapia del cáncer mediante la administración de un vector de virus que expresa uno o más antígenos de células de cáncer (o una molécula inmunológicamente similar) o cualquier otro inmunógeno que produce una respuesta inmunitaria contra una célula de cáncer. Para ilustrar, una respuesta inmunitaria puede ser producida contra un antígeno de células de cáncer en un sujeto mediante la administración de un vector de virus que comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica el antígeno de células de cáncer, por ejemplo para el tratamiento de un paciente con cáncer y/o para prevenir el desarrollo del cáncer en el sujeto. El vector de virus se puede administrar a un sujeto in vivo o mediante el uso de métodos ex vivo, como se describe aquí. Alternativamente, el antígeno de cáncer se puede expresar como parte de la cápsida del virus o asociarse de otro modo con la cápsida del virus (por ejemplo, como se describió anteriormente).

45 Como otra alternativa, cualquier otro ácido nucleico terapéutico (por ejemplo, iARN) o polipéptido (por ejemplo, citoquinas) conocido en la técnica se puede administrar para tratar y/o prevenir el cáncer.

50 Como se utiliza aquí, el término "cáncer" abarca cánceres de formación de tumores. Asimismo, el término "tejido canceroso" abarca tumores. Un "antígeno de células de cáncer" abarca antígenos tumorales.

55 El término "cáncer" tiene su significado entendido en la técnica, por ejemplo, un crecimiento incontrolado de tejido que tiene el potencial de extenderse a lugares distantes del cuerpo (es decir, metástasis). Los cánceres ejemplares incluyen, pero no se limitan a melanoma, adenocarcinoma, timoma, linfoma (por ejemplo, linfoma no Hodgkin, linfoma de Hodgkin), sarcoma, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de colon, leucemia, cáncer de útero, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer cervical, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de páncreas, cáncer de cerebro y cualquier otro cáncer o afección maligna conocida ahora o identificada más tarde. La divulgación proporciona un método para tratar y/o prevenir cánceres que forman tumores.

60 El término "tumor" también se entiende en la técnica, por ejemplo, como una masa anormal de células indiferenciadas dentro de un organismo multicelular. Los tumores pueden ser malignos o benignos. En los ejemplos representativos de los métodos descritos aquí se utilizan para prevenir y tratar tumores malignos.

65 Por los términos "tratar el cáncer", "tratamiento del cáncer" y términos equivalentes se pretende que la gravedad del cáncer se reduce o se elimina por lo menos parcialmente y/o la progresión de la enfermedad se hace más lenta y/o controlada y/o la enfermedad se estabiliza. En realizaciones particulares, estos términos indican que se impide la

metástasis del cáncer o se reduce o se elimina por lo menos parcialmente y/o se impide o reduce ese crecimiento de nódulos metastásicos o por lo menos se elimina parcialmente.

5 Por los términos "prevención del cáncer" o "prevenir cáncer" y términos equivalentes se pretende que los métodos por lo menos parcialmente, eliminen o reduzcan y/o retrasen la incidencia y/o gravedad de la aparición de cáncer. Alternativamente, la aparición de cáncer en el sujeto se puede reducir en posibilidad o probabilidad y/o retrasar.

10 Las células se pueden retirar de un sujeto con cáncer y en contacto con un vector de virus que expresa un antígeno de célula de cáncer de acuerdo con la presente invención. La célula modificada se administra a continuación al sujeto, con lo que se provoca una respuesta inmunitaria contra el antígeno de células de cáncer. Este método se puede emplear ventajosamente con sujetos inmunocomprometidos que no pueden montar una respuesta inmunitaria suficiente in vivo (es decir, no pueden producir anticuerpos potenciadores en cantidades suficientes).

15 Se sabe en la técnica que las respuestas inmunitarias se pueden potenciar mediante citoquinas inmunomoduladoras (por ejemplo, α -interferón, β -interferón, γ -interferón, ω -interferón, τ -interferón, interleuquina-1 α , interleuquina-1 β , interleuquina-2, interleuquina-3, interleuquina-4, interleuquina 5, interleuquina-6, interleuquina-7, interleuquina-8, interleuquina-9, interleuquina-10, interleuquina-11, interleuquina 12, interleuquina-13, interleuquina-14, interleuquina-18, factor de crecimiento de células B, ligando CD40, factor de necrosis tumoral- α , factor de necrosis tumoral- β , proteína-1 quimiotáctica de monocitos, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos, y linfoxina). De acuerdo con lo anterior, las citoquinas inmunomoduladoras (preferiblemente, citoquinas inductivas de CTL) se pueden administrar a un sujeto junto con el vector de virus.

20 Las citoquinas se pueden administrar por cualquier método conocido en la técnica. Las citoquinas exógenas se pueden administrar al sujeto, o como alternativa, un ácido nucleico que codifica una citocina se puede administrar al sujeto utilizando un vector adecuado, y la citoquina producida in vivo.

Sujetos, formulaciones farmacéuticas y modos de administración.

30 Los vectores de virus y cápsidas de acuerdo con la presente invención encuentran uso en aplicaciones veterinarias y médicas. Los sujetos adecuados incluyen tanto aves como mamíferos. El término "aviar" como se utiliza aquí incluye, pero no se limita a, pollos, patos, gansos, codornices, pavos, faisanes, loros, periquitos, y similares. El término "mamífero" como se utiliza aquí incluye, pero no se limita a, humanos, primates no humanos, bovinos, ovinos, caprinos, equinos, felinos, caninos, lagomorfos, etc. Los sujetos humanos incluyen sujetos neonatos, lactantes, jóvenes, adultos y geriátricos.

35 En realizaciones representativas, el sujeto está "en necesidad de" los métodos descritos aquí.

40 En realizaciones particulares, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un vector de virus y/o de cápsida de la invención en un portador farmacéuticamente aceptable y, opcionalmente, otros agentes medicinales, agentes farmacéuticos, agentes estabilizantes, reguladores, portadores, adyuvantes, diluyentes, etc. Para la inyección, el portador será normalmente un líquido. Para otros métodos de administración, el portador puede ser sólido o líquido. Para administración por inhalación, el portador será respirable, y opcionalmente puede estar en forma de partículas sólidas o líquidas.

45 Por "farmacéuticamente aceptable" se entiende un material que no es tóxico o de otro modo indeseable, es decir, el material se puede administrar a un sujeto sin provocar ningún efecto biológico indeseable.

50 Un aspecto es un método de transferencia de un ácido nucleico a una célula in vitro. El vector de virus se puede introducir en las células en la multiplicidad adecuada de infección de acuerdo con métodos de transducción estándar adecuados para las células objetivo particulares. Los títulos de vector de virus a administrar pueden variar, dependiendo del tipo de célula objetivo y el número, y el vector de virus particular, y se pueden determinar por los expertos en la técnica sin experimentación indebida. En ejemplos representativos de por lo menos aproximadamente 10^3 unidades infecciosas, opcionalmente por lo menos aproximadamente 10^5 unidades infecciosas se introducen a la célula.

55 La célula(s) en la que se introduce el vector de virus pueden ser de cualquier tipo, que incluye pero no se limita a, células neurales (que incluyen células de los sistemas nerviosos central y periférico, en particular, células del cerebro tales como neuronas y oligodendrocitos), células de pulmón, células del ojo (que incluyen células de retina, epitelio pigmentario de retina, y células de córnea), células epiteliales (por ejemplo, células del intestino y epiteliales respiratorias), células musculares (por ejemplo, células musculares esqueléticas, células musculares cardíacas, células del músculo liso y/o células del músculo del diafragma), células dendríticas, células pancreáticas (que incluyen células de los islotes), células hepáticas, células miocárdicas, células óseas (por ejemplo, citoblastos de médula ósea), citoblastos hematopoyéticos, células esplénicas, queratinocitos, fibroblastos, células endoteliales, células de próstata, células germinales, y similares. La célula puede ser cualquier célula progenitora. Como posibilidad adicional, la célula puede ser una célula madre (por ejemplo, célula madre neural, célula madre hepática). Como todavía una alternativa adicional, la célula puede ser una célula de cáncer o tumor. Por otra parte, la célula puede ser de cualquier especie de origen, como se indicó anteriormente.

El vector de virus se puede introducir en células in vitro con el propósito de administrar la célula modificada a un sujeto. En ejemplos particulares las células se han retirado de un sujeto, el vector de virus se introduce en el mismo, y las células se administran de nuevo en el sujeto. Los métodos de eliminación de células de sujeto para la manipulación ex vivo, seguido de la introducción de nuevo en el sujeto son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, patente de los Estados Unidos US No. 5,399,346). Alternativamente, el vector de virus recombinante se puede introducir en células de un sujeto donante, en células cultivadas, o en células a partir de cualquier otra fuente adecuada, y las células se administran a un sujeto en necesidad del mismo (es decir, un sujeto "receptor").

Las células adecuadas para suministro de ácido nucleico ex vivo son como se describió anteriormente. Las dosificaciones de las células a administrar a un sujeto variarán de la edad, condición y especie del sujeto, el tipo de célula, el ácido nucleico que se expresa por la célula, el modo de administración, y similares. Normalmente, por lo menos aproximadamente 10^2 a aproximadamente 10^8 células o por lo menos aproximadamente 10^3 a aproximadamente 10^6 células se pueden administrar por dosis en un portador farmacéuticamente aceptable. En realizaciones particulares, las células transducidas con el vector de virus se administran al sujeto en una cantidad de tratamiento efectivo o prevención efectiva en combinación con un portador farmacéutico.

En algunos ejemplos, el vector de virus se introduce en una célula y la célula se puede administrar a un sujeto para provocar una respuesta inmunogénica contra el polipéptido suministrado (por ejemplo, expresado como un transgén o en cápsida). Normalmente, se administra una cantidad de células que expresan una cantidad inmunogénicamente efectiva del polipéptido en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable. Una "cantidad inmunológicamente efectiva" es una cantidad del polipéptido expresado que es suficiente para evocar una respuesta inmunitaria activa contra el polipéptido en el sujeto al que se administra la formulación farmacéutica. En ejemplos particulares, la dosis es suficiente para producir una respuesta inmunitaria protectora (como se definió anteriormente). El grado de necesidad protección conferida no es completo o permanente, siempre que los beneficios de administrar el polipéptido inmunogénico superen a las desventajas de los mismos.

Un aspecto adicional es un método para administrar el vector de virus y/o de la cápsida del virus a los sujetos. La administración de los vectores de virus y/o cápsidas a un sujeto humano o un animal en necesidad del mismo puede ser mediante cualquier medio conocido en la técnica. Opcionalmente, el vector de virus y/o de cápsida se suministra en una dosis de tratamiento efectiva o prevención efectiva en un portador farmacéuticamente aceptable.

Los vectores y/o cápsidas de virus de la invención adicionalmente se pueden administrar para provocar una respuesta inmunogénica (por ejemplo, como una vacuna). Normalmente, las composiciones inmunogénicas de la presente invención comprenden una cantidad inmunogénicamente efectiva del vector de virus y/o de la cápsida en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable. Opcionalmente, la dosis es suficiente para producir una respuesta inmunitaria protectora (como se definió anteriormente). El grado de necesidad de protección conferida no es completo o permanente, siempre que los beneficios de administrar el polipéptido inmunogénico superen a las desventajas de los mismos. Los sujetos e inmunógenos son como se describieron anteriormente.

Las dosificaciones del vector de virus y/o de la cápsida que se va a administrar a un sujeto dependerá del modo de administración, enfermedad o afección que se va a tratar y/o prevenir, la condición del sujeto individual, el vector de virus particular o de cápsida, y el ácido nucleico que se va a suministrar, y similares, y se puede determinar de una manera rutinaria. Las dosis de ejemplo para lograr efectos terapéuticos son títulos de por lo 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, opcionalmente de aproximadamente 10^8 a 10^{13} unidades de transducción.

Más de una administración (por ejemplo, dos, tres, cuatro o más administraciones) se puede emplear para conseguir el nivel deseado de expresión génica durante un periodo de diversos intervalos, por ejemplo, diario, semanal, mensual, anual, etc.

Modos de ejemplo de administración incluyen administración oral, rectal, de transmucosa, intranasal, por inhalación (por ejemplo, por medio de un aerosol), bucal (por ejemplo, sublingual), vaginal, intratecal, intraocular, transdérmica, en el útero (o in ovo), parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intradérmica, intramuscular [que incluye la administración al músculo esquelético, del diafragma y/o cardíaco], intradérmica, intrapleural, intracerebral, e intraarticular), tópica (por ejemplo, a la piel y las superficies mucosas, que incluyen superficies de las vías respiratorias, y administración transdérmica), intralinfática y similares, así como también inyección directa a tejido u órgano (por ejemplo, en el hígado, músculo esquelético, músculo cardíaco, músculo del diafragma o el cerebro). La administración también puede ser a un tumor (por ejemplo, en o cerca de un tumor o un ganglio linfático). La ruta más adecuada en cualquier caso dado dependerá de la naturaleza y gravedad de la afección que se va a tratar y/o prevenir y de la naturaleza del vector particular que está siendo utilizado.

La administración al músculo esquelético incluye pero no se limita a la administración al músculo esquelético de las extremidades (por ejemplo, parte superior del brazo, parte inferior del brazo, pierna superior, y/o pierna inferior), espalda, cuello, cabeza (por ejemplo, lengua), tórax, abdomen, pelvis/perineo, y/o dedos. Los músculos esqueléticos adecuados incluyen, pero no se limitan a abductor (en la mano), abductor (en el pie), abductor del dedo gordo, abductor óseo del quinto metatarso, abductor corto del pulgar, abductor largo del pulgar, aductor corto, aductor del dedo gordo, aductor

largo, aductor mayor, aductor del pulgar, ancóneo, escaleno anterior, género articularis, bíceps braquial, bíceps femoral, braquial, braquiorradial, buccinador, coracobraquial, superciliar corrugador, deltoides, depresor de ángulo de boca, depresor del labio inferior, digástrico, interóseos dorsales (en el la mano), interóseos dorsales (en el pie), extensor radial breve del carpo, extensor radial del carpo largo, extensor cubital del carpo, extensor del meñique, extensor de los dedos, 5 extensor corto de los dedos, extensor largo de los dedos, extensor corto del dedo gordo, extensor largo del dedo gordo, extensor del índice, extensor corto del pulgar, extensor largo del pulgar, flexor radial del carpo, flexor cubital del carpo, flexor propio del quinto dedo (en la mano), flexor propio del quinto dedo (en el pie), flexor corto de los dedos, flexor largo de los dedos, flexor profundo de los dedos, flexor superficial de los dedos, flexor corto del dedo gordo, flexor largo del 10 dedo gordo, flexor corto del pulgar, flexor largo del pulgar, frontal, gastrocnemio, genihioideo, glúteo mayor, glúteo medio, glúteo menor, grácil, iliocostal cervical, iliocostal lumbar, iliocostal torácico, iliaco, gemelo inferior, oblicuo inferior, recto inferior, infraespinoso, interespinales, intertransvérsales, pterigoideo lateral, recto lateral, dorsal ancho, elevador del ángulo de la boca, elevador del labio superior, músculo elevador del labio superior y del ala de la nariz, elevador del párpado superior, elevador de la escápula, rotadores largos, longísimo de la cabeza, longísimo cervical, longísimo 15 torácico, largo de la cabeza, largo del cuello, lumbricales (en la mano), lumbricales (en el pie), masetero, pterigoideo medial, recto medial, escaleno medio, multífido, milohioideo, oblicuo de cabeza inferior, oblicuo de cabeza superior, obturador externo, obturador interno, occipital, omohioideo, oponente del meñique, oponente del pulgar, orbicular de los párpados, orbicular de la boca, palmar interóseo, palmar corto, palmar largo, pectíneo, pectoral mayor, pectoral menor, peroneo corto, peroneo largo, peroneo tercero, piriforme, interóseo plantar, plantar, platisma, poplíteo, escaleno posterior, pronador cuadrado, pronador redondo, psoas mayor, cuadrado femoral, cuadrado plantar, recto anterior de la cabeza, 20 recto lateral de la cabeza, recto posterior mayor de la cabeza, recto posterior menor de la cabeza, recto femoral, romboide mayor, romboides menor, risorio, sartorio, escaleno mínimo, semimembranoso, semiespinoso de la cabeza, semiespinoso cervical, semiespinoso del tórax, semitendinoso, serrato anterior, rotadores cortos, sóleo, espinal de la cabeza, espinal cervical, espinal del tórax, esplenio de la cabeza, esplenio cervical, esternocleidomastoideo, esternohioideo, esternotiroideo, estilohioideo, subclavio, subescapular, gemelo superior, oblicuo superior, recto superior, supinador, supraespinoso, temporal, tensor de la fascia lata, redondo mayor, redondo menor, torácico, tirohioideo, tibial anterior, tibial 25 posterior, trapecio, tríceps braquial, vasto intermedio, vasto externo, vasto medial, cigomático mayor y cigomático menor, y cualquier otro músculo esquelético adecuado como se conoce en la técnica.

El vector de virus y/o de la cápsida se puede suministrar al músculo esquelético mediante administración intravenosa, 30 administración intraarterial, administración intraperitoneal, perfusión de extremidades, (opcionalmente, perfusión aislada de extremidad de una pierna y/o el brazo; véase, por ejemplo Arruda et al., (2005) Blood 105: 3458-3464), y/o la inyección intramuscular directa. En ejemplos particulares el vector de virus y/o de la cápsida se administra a un miembro (brazo y/o pierna) de un sujeto (por ejemplo, un sujeto con distrofia muscular tal como DMD) mediante perfusión de extremidades, 35 opcionalmente perfusión aislada de extremidad (por ejemplo, administración intravenosa o intraarticular). Los vectores y/o cápsidas del virus de la invención se pueden administrar ventajosamente sin el empleo de técnicas "hidrodinámicas". El suministro de tejido (por ejemplo, a músculo) de los vectores de la técnica anterior es a menudo mejorada por técnicas hidrodinámicas (por ejemplo, administración intravenosa/intravenosa en un gran volumen), que aumentan la presión en la vasculatura y facilitan la capacidad del vector para cruzar la barrera de células endoteliales. Los vectores y/o cápsidas 40 virales de la invención se pueden administrar en ausencia de técnicas hidrodinámicas tales como infusiones de gran volumen y/o presión intravascular elevada (por ejemplo, mayor que la presión sistólica normal, por ejemplo, menos de o igual a un 5%, 10%, 15%, 20%, 25% de aumento en la presión intravascular sobre la presión sistólica normal). Dichos métodos pueden reducir o evitar los efectos secundarios asociados con las técnicas hidrodinámicas tales como edema, daño en los nervios y/o síndrome compartimental.

La administración al músculo cardíaco incluye la administración a la aurícula izquierda, aurícula derecha, ventrículo izquierdo, ventrículo y/o septo derecho. El vector de virus y/o de la cápsida se puede suministrar al músculo cardíaco 45 mediante la administración intravenosa, administración intraarterial tal como administración intraaórtica, inyección cardíaca directa (por ejemplo, en la aurícula izquierda, aurícula derecha, ventrículo izquierdo, ventrículo derecho), y/o la perfusión de la arteria coronaria.

La administración al músculo del diafragma puede ser por cualquier método adecuado, que incluye administración intravenosa, administración intraarterial, y/o administración intraperitoneal. 50

El suministro a un tejido objetivo también se puede lograr al suministrar un depósito que comprende el vector de virus y/o de la cápsida. En los ejemplos representativos de un depósito que comprende el vector de virus y/o de la cápsida se implanta en el tejido muscular esquelético, cardíaco y/o del diafragma o el tejido se puede poner en contacto con una película u otra matriz que comprende el vector de virus y/o de la cápsida. Dichas matrices o sustratos implantables se describen en la Patente de Estados Unidos No. 7,201,898. 55

En ejemplos particulares un vector de virus y/o cápsida de virus de acuerdo con la presente invención se administra a músculo esquelético, músculo del diafragma y/o músculo cardíaco (por ejemplo, para tratar y/o prevenir la distrofia muscular, enfermedades del corazón [por ejemplo, PAD o insuficiencia cardíaca congestiva]). 60

En los ejemplos representativos se utiliza la invención para tratar y/o prevenir trastornos del músculo esquelético, cardíaco y/o del diafragma. La divulgación proporciona un método para tratar y/o prevenir la distrofia muscular en un sujeto en necesidad del mismo, el método comprende: administrar una cantidad efectiva de tratamiento o prevención de un vector 65

de virus de la invención a un sujeto mamífero, en el que el vector de virus comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica la distrofina, una mini-distrofina, una micro-distrofina, propéptido miostatina, folistatina, receptor soluble de activina tipo II, IGF-1, polipéptidos antiinflamatorios tales como el mutante dominante B I kappa, sarcospan, utrofina, una micro-distrofina, laminina- α 2, α -sarcoglicano, β -sarcoglicano, γ -sarcoglicano, δ -sarcoglicano, IGF-1, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo contra la miostatina o propéptido de miostatina, y/o iARN contra la miostatina. El vector de virus se puede administrar al músculo esquelético, del diafragma y/o cardíaco, como se describe en otra parte aquí.

Alternativamente, se puede practicar la divulgación para suministrar un ácido nucleico al músculo esquelético, cardíaco o del diafragma, que se utiliza como una plataforma para la producción de un polipéptido (por ejemplo, una enzima) o ARN funcional (por ejemplo, iARN, microARN, ARN antisentido) que normalmente circula en la sangre o para la administración sistémica a otros tejidos para tratar y/o prevenir un trastorno (por ejemplo, un trastorno metabólico, tal como diabetes [por ejemplo, insulina], hemofilia [por ejemplo, Factor IX o Factor VIII], un trastorno mucopolisacárido [por ejemplo, síndrome de Sly, síndrome de Hurler, síndrome de Scheie, síndrome de Hurler-Scheie, síndrome de Hunter, síndrome de Sanfilippo A, B, C, D, síndrome de Morquio, síndrome de Maroteaux-Lamy, etc.] o un trastorno de almacenamiento lisosómico tal como enfermedad de Gaucher [glucocerebrosidasa] o enfermedad de Fabry [α -galactosidasa A] o un trastorno de almacenamiento de glucógeno como enfermedad de Pompe [ácido de α glucosidasa lisosomal]). Otras proteínas adecuadas para el tratamiento y/o prevención de trastornos metabólicos se describen aquí. El uso del músculo como plataforma para expresar un ácido nucleico de interés se describe en la publicación de patente US 2002/0192189.

Por lo tanto, como un aspecto, la divulgación abarca adicionalmente un método de tratamiento y/o prevención de un trastorno metabólico en un sujeto en necesidad del mismo, el método comprende: administrar una cantidad efectiva de tratamiento o prevención de un vector de virus de la invención al músculo esquelético de un sujeto, en el que el vector de virus comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido, en el que el trastorno metabólico es el resultado de una deficiencia y/o defecto en el polipéptido. Trastornos metabólicos ilustrativos y ácidos nucleicos que codifica polipéptidos heterólogos se describen aquí. Opcionalmente, se secreta el polipéptido (por ejemplo, un polipéptido es un polipéptido secretado en su estado nativo o que ha sido diseñado para ser secretado, por ejemplo, por asociación operable con una secuencia de señal secretora como se conoce en la técnica). Sin estar limitados por ninguna teoría en particular la administración al músculo esquelético puede resultar en la secreción del polipéptido en la circulación sistémica y suministro al tejido objetivo(s). Los métodos de suministro de vectores de virus al músculo esquelético se describen con más detalle aquí.

La divulgación también se puede practicar para producir ARN antisentido, iARN o otro ARN funcional (por ejemplo, una ribozima) para el suministro sistémico.

La descripción también proporciona un método para tratar y/o prevenir la insuficiencia cardíaca congénita o PAD en un sujeto en necesidad del mismo, el método comprende administrar una cantidad efectiva de tratamiento o prevención de un vector de virus de la invención a un sujeto mamífero, en el que el vector de virus comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica, por ejemplo, una Ca^{2+} -ATPasa de endoretículo sarcoplásmico (SERCA2a), un factor angiogénico, inhibidor de fosfatasa I (I-1) y fragmentos de los mismos (por ejemplo, I1C), iARN contra fosfolamban; un inhibidor de fosfolamban o molécula o dominante negativa como fosfolamban S16E, una proteína de dedos de cinc que regula el gen fosfolamban, receptor β 2-adrenérgico, quinasa del receptor β 2-adrenérgico (BARK), PI3 quinasa, calsarcán, un inhibidor de quinasa del receptor β -adrenérgico (β ARKct), inhibidor 1 de la proteína fosfatasa 1 y fragmentos de los mismos (por ejemplo, I1C), S100A1, parvalbúmina, adenilil ciclasa tipo 6, una molécula que efectúa atenuación de quinasa receptor tipo 2 acoplada a proteína G tal como una β ARKct activa constitutivamente truncada, PIM 1, PGC-1 α , SOD-1, SOD-2, EC-SOD, calicreína, HIF, timosina- β 4, mir-1, mir-133, mir-206, mir-208 y/o mir-26a.

Se pueden preparar inyectables en formas convencionales, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas, formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en líquido antes de la inyección, o como emulsiones. Alternativamente, se puede administrar el vector de virus y/o cápsidas de virus de la invención en forma de un local en lugar de sistémica, por ejemplo, en una formulación de liberación lenta o de liberación sostenida. Adicionalmente, el vector de virus y/o de la cápsida del virus pueden ser suministrados adheridos a una matriz quirúrgicamente implantable (por ejemplo, como se describe en la Publicación de Patente de Estados Unidos No. US-2004-0013645-A1).

[Los vectores de virus y/o cápsidas de virus divulgados aquí se pueden administrar a los pulmones de un sujeto mediante cualquier medio adecuado, opcionalmente mediante la administración de una suspensión en aerosol de partículas respirables compuestas por los vectores de virus y/o cápsidas de virus, que el sujeto inhala. Las partículas respirables pueden ser líquidas o sólidas. Los aerosoles de partículas líquidas que comprenden los vectores de virus y/o cápsidas de virus se pueden producir por cualquier medio adecuado, tal como con un nebulizador de aerosol accionado a presión o un nebulizador ultrasónico, como se conoce por aquellos expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos No. 4,501,729. Los aerosoles de partículas sólidas que comprenden los vectores y/o cápsidas de virus igualmente se pueden producir con cualquier generador de aerosol de medicamento de partículas sólidas, mediante técnicas conocidas en el arte farmacéutico.

Los vectores de virus y cápsidas de virus se pueden administrar a los tejidos del sistema nervioso central (por ejemplo, cerebro, ojo) y puede resultar ventajosa en la distribución más amplia del vector de virus o cápsida de lo que se observa en ausencia de la presente invención.

5 Los vectores de suministro de la invención se pueden administrar para tratar enfermedades del sistema nervioso central, que incluyen trastornos genéticos, trastornos neurodegenerativos, trastornos psiquiátricos y tumores. Enfermedades
 10 ilustrativas del SNC incluyen, pero no se limitan a enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, enfermedad de Canavan, enfermedad de Leigh, enfermedad de Refsum, síndrome de Tourette, esclerosis lateral primaria, esclerosis lateral amiotrófica, atrofia muscular progresiva, enfermedad de Pick, distrofia muscular,
 15 esclerosis múltiple, miastenia grave, enfermedad de Binswanger, trauma debido a lesión en médula espinal o cabeza, enfermedad Tay Sachs, enfermedad de Lesch-Nyan, epilepsia, infarto cerebral, trastornos psiquiátricos como los trastornos del estado de ánimo (por ejemplo, depresión, trastorno afectivo bipolar, trastorno afectivo persistente, trastorno secundario del estado de ánimo), esquizofrenia, dependencia a drogas (por ejemplo, alcoholismo y otras dependencias de sustancias), neurosis (por ejemplo, ansiedad, trastorno obsesivo, trastorno somatomorfo, trastorno disociativo, dolor,
 20 depresión post-parto), psicosis (por ejemplo, alucinaciones y delirios), demencia, paranoia, trastorno de déficit de atención, trastornos psicosexuales, trastornos del sueño, trastornos de dolor, e trastornos de alimentación o peso (por ejemplo, obesidad, caquexia, anorexia nervosa, bulimia y) y cánceres y tumores (por ejemplo, tumores de la hipófisis) del SNC.

20 Los trastornos del SNC incluyen trastornos oftálmicos que implican la retina, el tracto posterior, y el nervio óptico (por ejemplo, retinitis pigmentosa, retinopatía diabética y otras enfermedades degenerativas de la retina, uveítis, degeneración macular relacionada con la edad, glaucoma).

25 La mayoría, si no todas, las enfermedades y trastornos oftálmicos se asocian con uno o más de tres tipos de indicaciones: (1) angiogénesis, (2) inflamación, y (3) degeneración. Los vectores de suministro de la presente invención se pueden emplear para administrar factores anti-angiogénicos; factores antiinflamatorios; factores que retardan la degeneración celular, promueven el recambio celular, o promueven el crecimiento celular y combinaciones de los anteriores.

30 La retinopatía diabética, por ejemplo, se caracteriza por la angiogénesis. La retinopatía diabética se puede tratar mediante el suministro de uno o más factores antiangiogénicos o bien por vía intraocular (por ejemplo, en el vítreo) o vía periocular (por ejemplo, en la región de la sub Tenon). También se pueden coadministrar uno o más factores neurotróficos, ya sea por vía intraocular (por ejemplo, por vía intravítrea) o por vía periocular.

35 La uveítis implica inflamación. Uno o más factores antiinflamatorios se pueden administrar mediante administración intraocular (por ejemplo, vítreo o cámara anterior) de un vector de suministro de la invención.

La retinitis pigmentaria, por comparación, se caracteriza por degeneración de la retina. La retinitis pigmentaria se puede tratar por suministro intraocular (por ejemplo, administración vítreo) de un vector de suministro de codificación de uno o más factores neurotróficos.

40 La degeneración macular relacionada con la edad implica la angiogénesis y la degeneración retinal. Este trastorno se puede tratar mediante al administrar vectores de suministro de la invención que codifican uno o más factores neurotróficos por vía intraocular (por ejemplo, vítreo) y/o uno o más factores anti-angiogénicos intraocular o periocular (por ejemplo, en la región de sub-Tenon).

45 El glaucoma se caracteriza por aumento de la presión ocular y pérdida de células ganglionares de la retina. Los tratamientos para el glaucoma incluyen la administración de uno o más agentes neuroprotectores que protegen las células del daño excitotóxico utilizando los vectores de suministro de la invención. Dichos agentes incluyen antagonistas de N-metil D-aspartato (NMDA), agonistas de citocinas, y factores neurotróficos, suministrados por vía intraocular, opcionalmente por vía intravítrea.

50 La presente invención se puede utilizar para tratar las convulsiones, por ejemplo, para reducir el inicio, incidencia o gravedad de las convulsiones. La eficacia de un tratamiento terapéutico para las convulsiones se puede evaluar por medio del comportamiento (por ejemplo, agitación, palpitaciones del ojo o la boca) y/o electrográfico (la mayoría de las convulsiones tienen anomalías electroencefalográficas en firma). Por lo tanto, la invención también se puede utilizar para tratar la epilepsia, que se caracteriza por convulsiones múltiples en el tiempo.

55 En un ejemplo representativo, la somatostatina (o un fragmento activo de la misma) se administra al cerebro utilizando un vector de suministro de la invención para tratar un tumor pituitario. De acuerdo con este ejemplo el vector de suministro que codifica la somatostatina (o un fragmento activo de la misma) se administra mediante microinfusión en la pituitaria.
 60 Del mismo modo, dicho tratamiento se puede utilizar para tratar la acromegalia (secreción de hormona del crecimiento anormal de la pituitaria). Las secuencias de ácidos nucleicos (por ejemplo, No. de Acceso GenBank J00306) y de aminoácidos (por ejemplo, No. de Acceso GenBank P01166; que contienen péptidos activos procesados de la somatostatina-28 y la somatostatina-14) de somatostatinas son conocidas en la técnica.

65 En realizaciones particulares, el vector puede comprender una señal de secreción tal como se describe en la Patente de Estados Unidos No. 7,071,172.

5 En los ejemplos representativos el vector de virus y/o de la cápsida del virus se administra al SNC (por ejemplo, al cerebro o al ojo). El vector de virus y/o de la cápsida se pueden introducir en la médula espinal, tronco cerebral (bulbo raquídeo, protuberancia), cerebro medio (hipotálamo, tálamo, epítalamo, glándula pituitaria, sustancia negra, glándula pineal), cerebelo, telencéfalo (cuerpo estriado, cerebro incluyendo los lóbulos occipital, temporal, parietal y frontal, corteza, ganglios basales, hipocampo y portaamígdala), sistema límbico, corteza cerebral, cuerpo estriado, cerebro, y colículo inferior. El vector de virus y/o de la cápsida también se pueden administrar a diferentes regiones del ojo tales como la retina, córnea y/o nervio óptico.

10 El vector de virus y/o de la cápsida se puede suministrar en el líquido cefalorraquídeo (por ejemplo, mediante punción lumbar) para administración más dispersa del vector de suministro. El vector de virus y/o de cápsida adicionalmente se puede administrar por vía intravascular al SNC en situaciones en las que la barrera hematoencefálica ha sido perturbada (por ejemplo, tumor cerebral o infarto cerebral).

15 El vector de virus y/o de la cápsida se puede administrar a la región(s) deseada del SNC por cualquier ruta conocida en la técnica, que incluye pero no se limita a, suministro intratecal, intra-ocular, intracerebral, intraventricular, intravenosa (por ejemplo, en presencia de un azúcar tal como manitol), intranasal, intra-aural, intra-ocular (por ejemplo, intra-vítrea, sub-retinal, cámara anterior) y peri-ocular (por ejemplo, región de sub-Tenon) así como el suministro intramuscular con suministro retrógrado a las neuronas motoras.

20 En ejemplos particulares, el vector de virus y/o de la cápsida se administra en una formulación líquida por inyección directa (por ejemplo, inyección estereotáctica) a la región deseada o un compartimento en el SNC. En otros ejemplos, el vector de virus y/o de la cápsida se pueden proporcionar por la aplicación tópica a la región deseada o por administración intranasal de una formulación de aerosol. La administración en el ojo, puede ser mediante aplicación tópica de gotas de líquido. Como una alternativa adicional, el vector de virus y/o de la cápsida se puede administrar como una formulación de liberación lenta sólida (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos No. 7,201,898).

25 En los ejemplos todavía adicionales, el vector de virus se puede utilizar para el transporte retrógrado para tratar y/o prevenir enfermedades y trastornos que implican las neuronas motoras (por ejemplo, esclerosis lateral amiotrófica (ALS); atrofia muscular espinal (SMA), etc.). Por ejemplo, el vector de virus se puede suministrar al tejido muscular, del cual se puede migrar en neuronas.

30 Habiendo descrito la presente invención, la misma se explicará con mayor detalle en los siguientes ejemplos, que se incluyen aquí para solo propósitos de ilustración, y que no pretenden ser limitantes a la invención.

35 EJEMPLOS

40 Los inventores han explotado la plasticidad del dominio de unión a heparina en AAV2 para generar cepas de AAV sintéticas con tropismos únicos en tejidos sistémicos. Utilizando un método de dominio de intercambio, los inventores sustituyen un motivo de unión de sulfato de heparina lineal sobre la cápsida de AAV serotipo 2 con los residuos de aminoácidos correspondientes de diversos otros serotipos y variantes de AAV, así como cepas sintéticas (véase la Tabla 5). La atenuación de la unión de sulfato de heparina a través de este método de mutagénesis integral produjo tres grupos de cápsidas de AAV quiméricas con fenotipos superpuestos: (a) mutantes de AAV capaces de propagación sistémica; (b) mutantes de AAV desorientados del hígado y (c) mutantes de AAV con bajo transducción de nivel.

45 Los inventores generaron un panel de cápsidas derivadas de AAV2 quiméricas, deficientes en unión de heparina, al intercambiar el dominio de unión a heparina 585-RGNRQA-590 con los residuos de aminoácidos derivados del dominio de la cápsida correspondiente en diversos aislados de AAV. En el cribado in vivo del panel de vector AAV después de la administración intravenosa en ratones se llevó a cabo a través de formación de imágenes bioluminiscentes en animales vivos. Este método dio como resultado el descubrimiento de diversos cápsidas de AAV quiméricas que exhiben perfiles de transducción sistémica distintos, así como mutantes con sólo la transducción de bajo nivel para cualquier tipo de tejido.

50 Un vector quimérico, AAV2i8, se transduce selectivamente al tejido muscular cardíaco, así como tejido de músculo esquelético con alta eficiencia. La cápsida AAV2i8, que se desorienta desde el hígado, parece atravesar la vasculatura sanguínea para transducir eficientemente una amplia variedad de grupos musculares. El análisis comparativo de las topologías de la superficie de la cápsida revela una huella quimérica sobre el eje de simetría de tres veces en la cápsida AAV2i8 (datos no mostrados) que pueden contribuir a la transducción de perfil atípico observado. La naturaleza quimérica de AAV2i8 es corroborada por la observación de que las cápsidas de AAV2i8 solo se neutralizan modestamente cuando se exponen a suero anti-AAV2 o suero humano (véase las Tablas 6 y 7). Además de ser desorientada desde el hígado, la AAV2i8 demuestra una capacidad para atravesar la vasculatura arterial y transducir el músculo cardíaco y esquelético con una alta eficiencia comparable a los vectores AAV8.

TABLA 5

Motivo hexapéptido (585-590)	cepa AAV (s)	Tropismo**	Eficacia de transducción (músculo)	Eficiencia de transducción (hígado)

RGNRQA	AAV2	hígado	-	++
SSSTDP	2i1 2i6	N/A	-	-
SSNTAP	2i3a/3b	N/A	-	-
SNSNLP	2i4	N/A	-	-
SSTTAP	2i5	N/A	-	-
SAQAQA	2i9	N/A	-	-
QQNTAP	2i8 2irh43 2irh49-53 2irh57 2irh58 2irh64	Músculo sistémico	++++	+
QANTGP	2i10 2irh40	Músculo sistémico	++	-
QTNTGP	2irh38	Músculo sistémico	++	-
QTNGAP	2irh2	Músculo sistémico	+	-
NATTAP	2i11 2i12 2irh32-34	Músculo sistémico	+	-
QQNTAP	AAV8	sistémico (Multi- órgano)	++++	++++
			(músculo)	(hígado)

* (-) No se observa transducción (+) una unidad de registro relativa ** Basado en o número de copias del genoma de análisis de imagen y/o niveles de expresión de luciferasa

TABLA 6

Vector	Sera	AAV2
AAV2		1: 2500
AAV8		<1 : 10
AAV2i8		1:40

TABLA 7

Asunto ID	título NA a AAV		
	AAV2	AAV8	AAV2i8
CHI 2-17	256	<20 (8)	<20 (16)
DEN 4-8	256	<20 (8)	<20 (8)
DEN 20- 7	64	<20 (<2)	<20 (<2)
IND 1-5	512	<20 (16)	< 20 (16)

Ejemplo 1

5

Generación de mutantes de bucle interno de AAV2 (serie AAV2i)

El motivo de unión a heparina, 585-RGNRQA-590, se ubica en el bucle IV en el eje de simetría de tres veces en la superficie de la cápsida de AAV2. A través de mutagénesis dirigida al sitio, el motivo hexapéptido se sustituyó con aminoácidos (situados adyacentes a un residuo de glutamina conservado) de diferentes serotipos de AAV y aislados de primate no humanos correspondiente para generar una serie de mutantes AAV2i (véase Tabla 5). Los títulos de todos los mutantes AAV2i fueron comparables con los de los vectores AAV2 parentales.

10

Ejemplo 2

15

Los mutantes AAV2i son deficientes

En unión y transducción de heparina in vitro

20

En el estudio actual, los mutantes AAV2i que contienen residuos de aminoácidos Q, A, S o N en la posición 585 y T, N, A o G en la posición 588 no pudieron para unirse a la heparina como se demuestra por ensayos de unión de columna de afinidad. Los perfiles de elución representativos de cápsidas parentales AAV2 y un dicho mutante, AAV2i8, se muestran

en la Figura 1a. Mientras que la fracción del pico AAV2 se eluye a NaCl ~300 mM, la cápsida AAV2i8 es incapaz de unirse a heparina en condiciones fisiológicas (pH 7.4, NaCl 150 mM).

5 En general, los mutantes AAV2i fueron deficientes en diversos órdenes de magnitud en la transducción de células HEK293 en comparación con el vector de AAV2 parental. Diversos ejemplos representativos se muestran en la Figura 1b. Esta observación se puede atribuir a la incapacidad de los mutantes AAV2i para obligar a los proteoglicanos de sulfato de heparina de la superficie celular. Sobre la base de la razón de que ciertos serotipos de AAV (1, 4, 5 y 6) utilizan ácido siálico ligado a N u O como un receptor primario, también se determinó si las eficiencias de transducción modestas mostradas por los mutantes AAV2i se pueden explicar mediante la unión de ácido siálico. Sin embargo, como se muestra en la figura 1b, el tratamiento de células HEK293 con sialidasa para eliminar grupos de ácido siálico de superficie expuesta no afectó la eficacia de transducción de AAV2i1, 2i4 o 2i5. Las eficacias de transducción de vectores AAV2, AAV2i7 y 2i8 parentales también se verán afectadas. En contraste, la transducción por AAV4, que utiliza ácido siálico unido por O como un receptor primario disminuyó en un orden de magnitud. Por último, ninguna ventaja significativa se observó en la capacidad de los mutantes AAV2i para infectar células CHOpgsD negativas a sulfato de heparina, que son relativamente no permisivas para los vectores de AAV2 parentales (Figura 1C). Los niveles de transducción modestos en AAV2 posiblemente se pueden atribuir a la interacción no específica con sulfato de condroitina, sobreexpresado en la superficie de las células CHOpgsD.

Ejemplo 3

20 AAV2i8 exhibe un fenotipo distinto in vivo

A pesar de los bajos niveles de transducción observada in vitro, determinamos los perfiles de tropismo de tejido de mutantes AAV2i en ratones normales Balb/C utilizando formación de imágenes con bioluminiscencia de animales vivos. Los mutantes AAV2i 1, 3, 4, 5, 7, 8 y vectores AAV2 parentales que empaquetan el transgen de luciferasa de luciérnaga dirigido por el promotor de citomegalovirus (CMV) se inyectaron a una dosis de 1×10^{10} genomas de vector por ratón, por vía intramuscular en la pata posterior derecha o por vía intravenosa a través de la vena de la cola.

30 En general, la mayoría de los mutantes AAV2i pareció para exhibir transducción de bajo nivel sobre la base de imágenes bioluminiscentes obtenidas a 1 semana después de la administración (Figuras 2A y 2B). Una excepción notable fue AAV2i8.

A diferencia del AAV2, que muestra tropismo preferencial por el hígado de murino, el AAV2i8 demuestra un perfil de transducción sistémica. El AAV2i8 de murino se transduce de la extremidad posterior del músculo esquelético con una eficiencia moderada después de la administración intramuscular (Figura 2a). Después de administración intravenosa, el AAV2i8 muestra un perfil de transducción sistémico (Figura 2b) independientemente de la duración de la expresión génica o si el vector se administra a través de la vena de la cola o la vena portal (Figura 3).

Ejemplo 4

40 Mutantes de AAV2i con un motivo 585-Q/NXXTXP-590 que muestran un perfil de transducción sistémica

Después de las observaciones preliminares con vectores AAV2i8 in vivo, se administraron diversos mutantes AAV2i con motivos 585-QXXTXP-590 o 585-NXXTXP-590 así como vectores de AAV2 y AAV8 parentales como controles en los ratones. Todos los vectores de empaquetamiento del transgen de la luciferasa conducidos por el promotor de pollo beta-actina (CBA) se administraron a una dosis de 5×10^{10} genomas de vector por ratón y se obtuvieron imágenes de animales vivos 10 días después de la administración. Como se muestra en la Figura 4, los mutantes AAV2i con residuos Q/N585, T588 y P590 parecen mostrar perfiles de transducción sistémicos similares a los vectores AAV8. La significativamente mayor eficiencia de transducción exhibida por AAV2i8 en comparación con vectores AAV2i10, AAV2i11, AAV2irh.2 y AAV2irh.38 destaca la sutil sinergia entre los residuos localizados dentro del motivo hexapéptido en conferir tropismo tisular sistémico. En contraste, los vectores AAV2 muestran un tropismo preferencial para el hígado como se estableció anteriormente.

55 Es digno de mencionar que el motivo 585-QQNTAP-590 fue incapaz de conferir tropismo sistémico cuando se incorporó en el dominio correspondiente en cápsidas AAV1 o AAV3 (Figura 5).

Ejemplo 5

El AAV2i8 se desorienta del hígado y exhibe tropismo selectivo de músculo

60 Con base en los patrones de transducción sistémicos relativamente similares mostrados por los mutantes anteriormente mencionados después de administración intravenosa en ratones, la cepa AAV2i8 derivada de laboratorio fue elegida como un candidato principal para la caracterización adicional. Con el fin de determinar la eficacia de transducción de AAV2i8 en comparación con vectores de AAV2 y AAV8 parentales, se cuantificó la expresión del transgén luciferasa y el número de copias del genoma en lisados de tejido cardíaco, músculo esquelético y hepático a las 2 semanas después de administración. Como se muestra en la figura 6a, los vectores de AAV8 transducen de forma ubicua el músculo y tejido hepático con una alta eficiencia corroborando el perfil transducción sistémica observado anteriormente en la Figura 4.

Aunque menos eficiente que AAV8, los vectores AAV2 preferiblemente translucen el hígado y sólo muestran los niveles de transducción modestos en el tejido muscular. En contraste, el AAV2i8 parece transducir preferiblemente tejido muscular con alta eficiencia similar a AAV8 y se desorientó simultáneamente desde el hígado.

- 5 Los perfiles de expresión del transgen de luciferasa anteriormente mencionado son corroborados por biodistribución de copias del genoma del vector en los tejidos musculares y del hígado tal como se determina por Q-PCR (Figura 6b). En el caso de vectores de AAV2 y AAV8, una parte desproporcionadamente de alta cantidad de copias de genoma de vectores fueron recuperadas del tejido de hígado en comparación con el tejido muscular cardíaco o esquelético. Esta última observación da fe del tropismo hepático preferencial de los vectores AAV2 y AAV8, aunque el AAV8 también parece transducir tejido muscular con una eficiencia similar. En el caso de AAV2i8, la falta de secuestro de genomas de vector en el tejido hepático y re-dirección al tejido muscular es particularmente sorprendente. Los bajos niveles de copias de genoma del vector AAV2i8 fueron recuperados de otros órganos importantes tales como el cerebro, pulmón y bazo (datos no mostrados).
- 10
- 15 Las excepciones notables a mutantes AAV2i que contienen el motivo 585-Q/NXTXP-590, incluyen AAV2i7 (585-AANTAA-590) y AAV2irh.36 (585-SSTAGP-590), que también parecen un perfil de transducción sistémica. A pesar de desorientación en el eficiente, el AAV2i7 transduce el tejido muscular con significativamente menor eficiencia en comparación con los vectores AAV2i8 y AAV8 (datos no mostrados). Curiosamente, la mutación de 585-AANTAA-590 a 585-QQNTAA-590 (que carece del residuo de P590 en AAV2i8) restaura el tropismo hepático y disminuye la eficiencia general de la transducción. Por otro lado, mientras que el AAV2irh.36 muestra moderada eficacia de transducción sistémica, este vector parece haber retenido tropismo hepático significativo (datos no mostrados). La mutación de 585-SSTAGP-590 a 585-PSTAGP-590 en AAV2irh.36 resultó en muy pobre transducción in vivo. Las últimas observaciones sugieren que, en general, la atenuación de unión a heparina puede resultar en desorientación en el hígado y diseminación sistémica de vectores derivados de AAV2. Sin embargo, los dominios específicos tales como el motivo 585-Q/NXTXP-590 podrían conferir transducción sistémica altamente eficiente.
- 20
- 25

Ejemplo 6

El AAV2i8 transduce un amplio rango de grupos musculares

- 30 Con el fin de determinar la extensión de la difusión global de AAV2i8 después de administración intravenosa, se cosecharon diferentes grupos de músculos de ratones Balb/C a las 4 semanas después de administración. Como se muestra en la Figura 7, el AAV2i8 transduce un amplia gama de grupos de músculos de los antebrazos murinos y las patas traseras así como intercostal, faciales y los músculos abdominales. Notablemente, cardíaco y músculo del diafragma se transducen por AAV2i8 con una alta eficiencia, mientras que otros órganos importantes, tales como el cerebro, el pulmón y el bazo, se transducen con baja eficiencia. Estos resultados distinguen el tropismo de tejido de la cápsida AAV2i8 de cualquier serotipo de AAV de origen natural o aislado que hasta el momento se ha caracterizado (Figura 8).
- 35

Ejemplo 7

El AAV2i8 atraviesa los vasos sanguíneos con una alta eficiencia

- 40 Una técnica de la extremidad posterior perfusión aislada se utilizó para examinar la eficiencia con que AAV2i8 atraviesa la barrera de los vasos sanguíneos. El AAV2i8 se transluce de la extremidad posterior del músculo esquelético tan eficientemente como el AAV8 a un volumen bajo de inyección, a dosis de vector moderada y alta (Figuras 9a). En dosis bajas de vector, el AAV8 muestra incrementos de tres a de diez veces en la eficacia de transducción en volúmenes más altos de inyección. Sin embargo, el AAV2i8 atraviesa los vasos sanguíneos y transduce el músculo esquelético subyacente con una alta eficiencia sin tener en cuenta el volumen de inyección.
- 45

- 50 El tropismo atípico de AAV2i8 se distingue de serotipos de AAV naturales 8 y 9 y sugiere que los vectores de AAV de ingeniería se pueden adaptar para aplicaciones clínicas específicas. El AAV2i8 mostró depuración en sangre marcadamente reducida y parece persistir más de 48 horas en la sangre (Figura 9B). Más aún, los niveles de expresión de transgenes de luciferasa específicos de músculo aumentaron gradualmente durante el curso de diversas semanas (Figura 10). En contraste, el número de copias de AAV8 del genoma vector disminuyó rápidamente, aproximándose a los niveles de fondo dentro del mismo período de tiempo. Estos resultados y observaciones anteriores de que otros serotipos de AAV con tropismo tisular sistémica tienen larga vida media de circulación sugieren que las estrategias para manipular el tiempo de circulación de las cápsidas AAV en sangre se podría permitir el control sobre el tropismo del vector.
- 55

Ejemplo 8

Inserción/sustitución en la posición 265 de la proteína de cápsida que restaura el tropismo de hígado para AAV2i8

- 60 Se generaron nuevos vectores en los que se insertó un ácido aspártico o ácido glutámico luego de la posición de aminoácido 264 (numeración con respecto a la subunidad de la cápsida AAV2 VP1) del vector AAV2i8 (2i8D y 2i8E, respectivamente). Se inyectaron ratones BALB/c Hembra (Figura 11; parte superior) y macho (Figura 11; parte inferior) por vía intravenosa a través de la vena de la cola con vectores AAV2, AAV8, AAV9, 2i8D o 2i8E (dosis 1×10^{11} vg en 200
- 65

50 µl de PBS) que se empaca en el casete CBA-Luc. La formación de imágenes de animales bioluminiscentes vivo se utilizó para evaluar el tropismo del vector y la expresión de luciferasa 4 días después de la inyección. Los niveles de transducción sistémica para los vectores 2i8D y 2i8E fueron similares a los observados para el AAV8 recombinante y vectores AAV9 (Figura 11). Además, aunque había algunos patrones de expresión dependientes de género, la eficiencia de transducción de hígado fue, en general, similar entre los vectores 2i8D y 2i8E en comparación con los vectores de AAV8 y AAV9 (Figura 11). Por lo tanto, aunque la sustitución del motivo QQNTAP en las posiciones 585 a través de 590 (inclusive) de la proteína de cápsida AAV2 resulta en desorientar desde el hígado en comparación con los vectores AAV2 o AAV8, la inserción adicional de un ácido aspártico (D) o ácido glutámico (E) después del aminoácido 264 fue capaz de restaurar el tropismo hígado a niveles similares a los observados con AAV8 o AAV9. Por otra parte, los vectores 2i8D y 2i8E también fueron capaces de mantener tropismo muscular extendido como se ve con AAV2i8 vector.

En experimentos adicionales, se insertan otros aminoácidos en la posición 264 en el vector AAV2i8 (por ejemplo, valina, leucina, lisina, arginina, treonina, serina, tirosina, glicina, alanina, prolina, asparagina, fenilalanina, tirosina o glutamina), y los patrones de transducción y la expresión de genes se evalúan como se describió anteriormente.

En otros estudios, el motivo QQNTAP se sustituye en las posiciones correspondientes a los aminoácidos 585 a 590 (inclusive) de la subunidad de cápsida de AAV de otro AAV con y sin la adición de una inserción /sustitución de aminoácido en la posición 265 (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico, alanina, leucina, lisina, arginina, treonina, serina, tirosina, glicina, alanina, prolina, asparagina, fenilalanina, tirosina o glutamina), y los patrones de transducción y la expresión de genes se evalúan como se describió anteriormente.

Ejemplo 9

Estudios en el cerebro

En un estudio adicional, se generó un vector de AAV2 que tiene un ácido aspártico insertado en la posición 264 de la proteína de la cápsida siguiente (AAV2-265D). Las ratas recibieron vector AAV2, 2i8, AAV2-265D o 2i8D (descrito en el Ejemplo 8) que expresan un transgén GFP mediante inyección estereotáctica en el cerebro. El AAV2-265D demostró niveles más altos de expresión de GFP en comparación con AAV2; Sin embargo, ninguno de los vectores mostró mucho más diseminado más allá del sitio de la inyección (datos no mostrados). En contraste, la inyección del vector 2i8 en el cerebro dio lugar a sólo bajos niveles de transducción tal como se evaluó por la expresión de GFP. La incorporación del ácido aspártico en la posición 265 en el vector 2i8D restauró transducción en el cerebro y también dio lugar a mucho más extensa propagación del lugar de inyección por todo el cerebro (por ejemplo, hipocampo y cuerpo estriado) en comparación con cantidades equivalentes de vectores AAV2 y AAV2-265D (datos no mostrados). Para todos los vectores, las neuronas eran el tipo de células primarias transducidas (datos no mostrados).

En experimentos adicionales, otros aminoácidos se insertan luego de la posición 264 en el vector AAV2i8 (por ejemplo, ácido glutámico, valina, leucina, lisina, arginina, treonina, serina, tirosina, glicina, alanina, prolina, asparagina, fenilalanina, tirosina o glutamina), y los patrones de transducción, vector propagación, y expresión génica en el cerebro se evalúan como se describió anteriormente.

En otros estudios, el motivo QQNTAP se sustituye en las posiciones correspondientes a los aminoácidos 585 a través de 590 (inclusive) de la subunidad de cápsida de AAV de otro AAV con y sin la adición de una inserción de aminoácido/sustitución en la posición 265 (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico, alanina, leucina, lisina, arginina, treonina, serina, tirosina, glicina, alanina, prolina, asparagina, fenilalanina, tirosina o glutamina), y la transducción de patrones, vector de propagación, y la expresión génica en el cerebro se evaluó como se describió anteriormente.

Ejemplo 10

Resumen de las características de mutantes AAV2i

Los mutantes AAV2i de este estudio fueron incapaces de unirse a heparina (Figura 1a). La incapacidad para unirse a heparina resulta en disminución significativa en la eficiencia de transducción in vitro, así como in vivo después de administración intramuscular, así como intravenosa en ratones (Figura 2a y 2b).

Una excepción sorprendente en este sentido es el mutante AAV2i8, en el que se observa un perfil de transducción sistémica luego de administración intravenosa (Figura 2b). Más investigación condujo al descubrimiento de que los mutantes AAV2i con un motivo Q/NXXTXP demuestran tropismo sistémico y los niveles de transducción superiores en contraste con vectores parentales AAV2 y otros mutantes AAV2i en ratones (que se resumen en la Tabla 5). Curiosamente, los mutantes AAV2i8 y relacionados exhiben un perfil de transducción atípico caracterizado por un interruptor en el tropismo de hígado a músculo (figuras 6a, 6b, 8). Por otra parte, este último perfil de transducción es también distinto de AAV8 y AAV9, que transduce múltiples órganos después de administración sistémica.

Ejemplo 11

Análisis comparativo del mapa de superficie de AAV2i8 con cápsidas AAV2 y AAV8

- Un análisis comparativo del mapa de superficie de AAV2i8 con cápsidas AAV2 y AAV8 indica que una huella única se genera en la incorporación de 585-QQNTAP-590 de dominio en el contexto de la plantilla de cápsida AAV2 (datos no mostrados). La superficie de la cápsida quimérica resultante puede facilitar interacciones específicas con receptores secundarios endógenos y/o alternativas distintas de aquellos mediados a través de interacciones AAV2-heparina. Adicionalmente, la capacidad de alterar significativamente la topología de la superficie de la cápsida mediante el canje de un motivo lineal apoya este método para la generación de cápsidas con perfiles antigénicos distintos de los serotipos parentales (véase las Tablas 6 y 7).
- 5
- 10 Lo anterior es ilustrativo de la presente invención, y no se debe interpretar como limitante de la misma. La invención se define por las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una proteína de cápsida de virus adeno-asociado 2 (AAV2) modificada selectivamente, en la que la modificación selectiva resulta en la inserción y/o supresión y/o sustitución de menos de 20 aminoácidos contiguos y en la que la modificación selectiva comprende una sustitución de 6 aminoácidos contiguos en los aminoácidos correspondientes a las posiciones de aminoácidos 585 a 590 (numeración de VP1) de la proteína de cápsida AAV2 nativa, y resulta en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de: QQNTAP; AANTAA; SSSTDP; SNSNLP; SSTTAP; SAQAQA; QANTGP; NATTAP; SSNTAP; QTNTGP y QTNGAP.
- 10 2. Una cápsida AAV que comprende la proteína de la cápsida AAV2 modificada de la reivindicación 1.
3. Un vector que comprende el virus de:
- 15 (a) la cápsida de AAV de la reivindicación 2; y
(b) un ácido nucleico que comprende por lo menos una secuencia de repetición terminal,
en la que el ácido nucleico está encapsidado por la cápsida de AAV.
- 20 4. El vector de virus de la reivindicación 3, en el que el vector de virus exhibe tropismo sistémico al músculo esquelético, cardíaco y el diafragma.
5. El vector de virus de la reivindicación 3 o 4, en el que el vector de virus ha reducido tropismo al hígado.
- 25 6. Una formulación farmacéutica que comprende el vector de virus de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5 en un portador farmacéuticamente aceptable.
- 30 7. Un método para administrar un ácido nucleico a una célula in vitro o ex vivo, el método comprende poner en contacto la célula con el vector de virus de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5 o la formulación farmacéutica de la reivindicación 6.
- 35 8. El vector de virus de cualquier una de las reivindicaciones 3 a 5 o la formulación farmacéutica de la reivindicación 6 para uso en el tratamiento de un sujeto que tiene, o está en riesgo de, un trastorno seleccionado del grupo que consiste de una distrofia muscular que incluye 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 masa muscular, enfermedades del corazón que incluyen insuficiencia cardíaca congénita o enfermedad de la arteria periférica, hiperplasia de la íntima, un trastorno neurológico, que incluye epilepsia, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson o enfermedad de Alzheimer, una enfermedad autoinmunitaria, fibrosis quística, talasemia, síndrome de Hurler, síndrome de Sly, el síndrome de Scheie, síndrome de Hurler-Scheie, síndrome de Hunter, Síndrome de Sanfilippo A, B, C, D, Síndrome de Morquio, síndrome de Maroteaux-Lamy, enfermedad de Krabbe, fenilcetonuria, enfermedad de Batten, ataxia cerebral espinal, deficiencia del receptor de LDL, hiperamonemia, anemia, artritis, enfermedad degenerativa de la retina que incluye degeneración macular, adenosina desaminasa deficiencia, y cáncer que incluye cánceres que forman tumores.
- 40 9. El vector de virus de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5 o la formulación farmacéutica de la reivindicación 6 para uso en el tratamiento de un sujeto según la reivindicación 8, en el que el vector de virus o formulación farmacéutica se administra al músculo esquelético, músculo cardíaco y/o músculo del diafragma, opcionalmente en el que el vector de virus o formulación farmacéutica se administra por vía intravenosa.
- 45 10. El vector de virus de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5 o la formulación farmacéutica de la reivindicación 6 para uso en el tratamiento de un sujeto según la reivindicación 8, en el que el sujeto tiene o está en riesgo de distrofia muscular o un trastorno metabólico o enfermedades del corazón, opcionalmente en las que la enfermedad del corazón es o insuficiencia cardíaca congestiva o enfermedad arterial periférica.
- 50

Figura 1

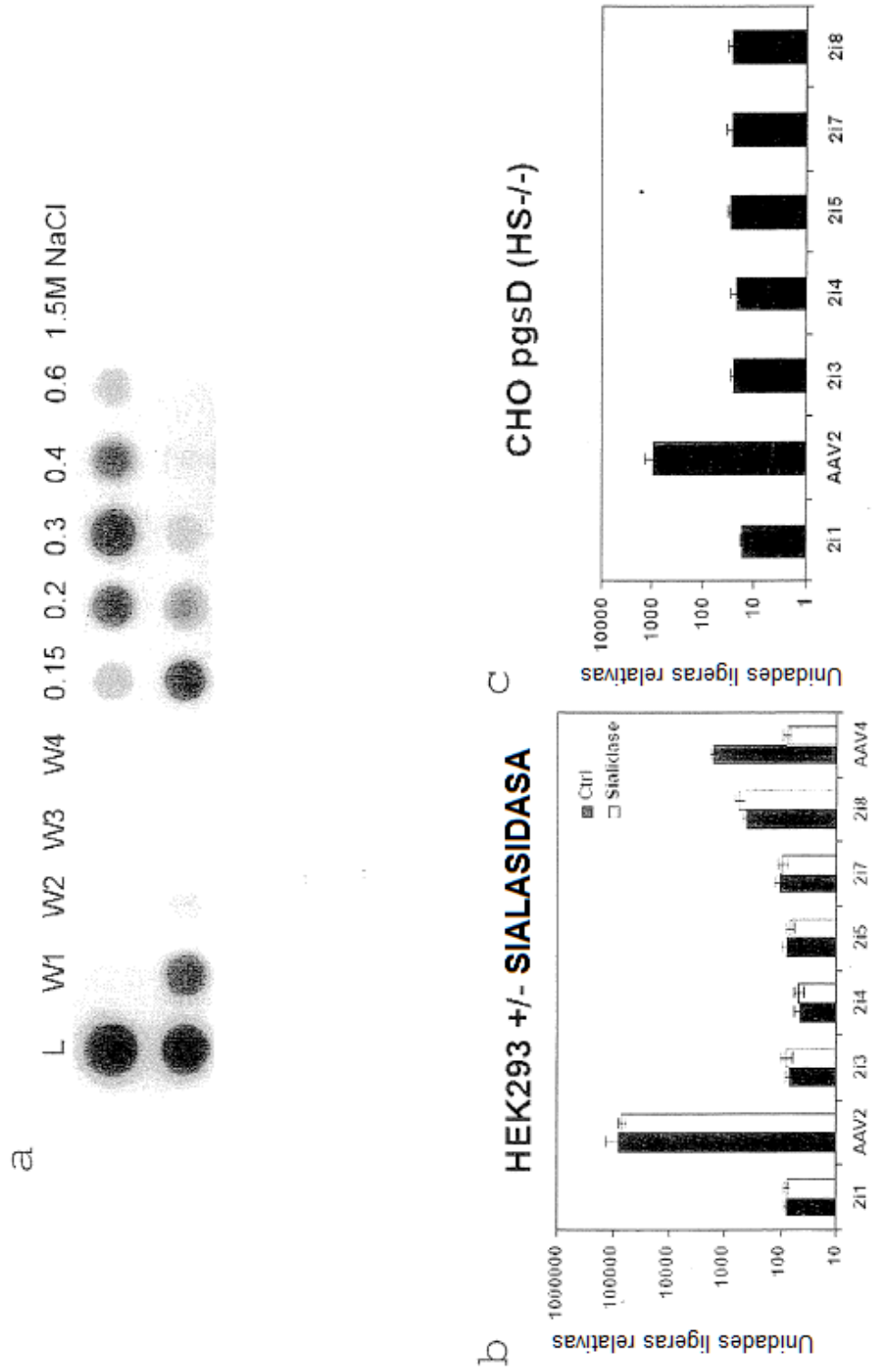


Figura 2

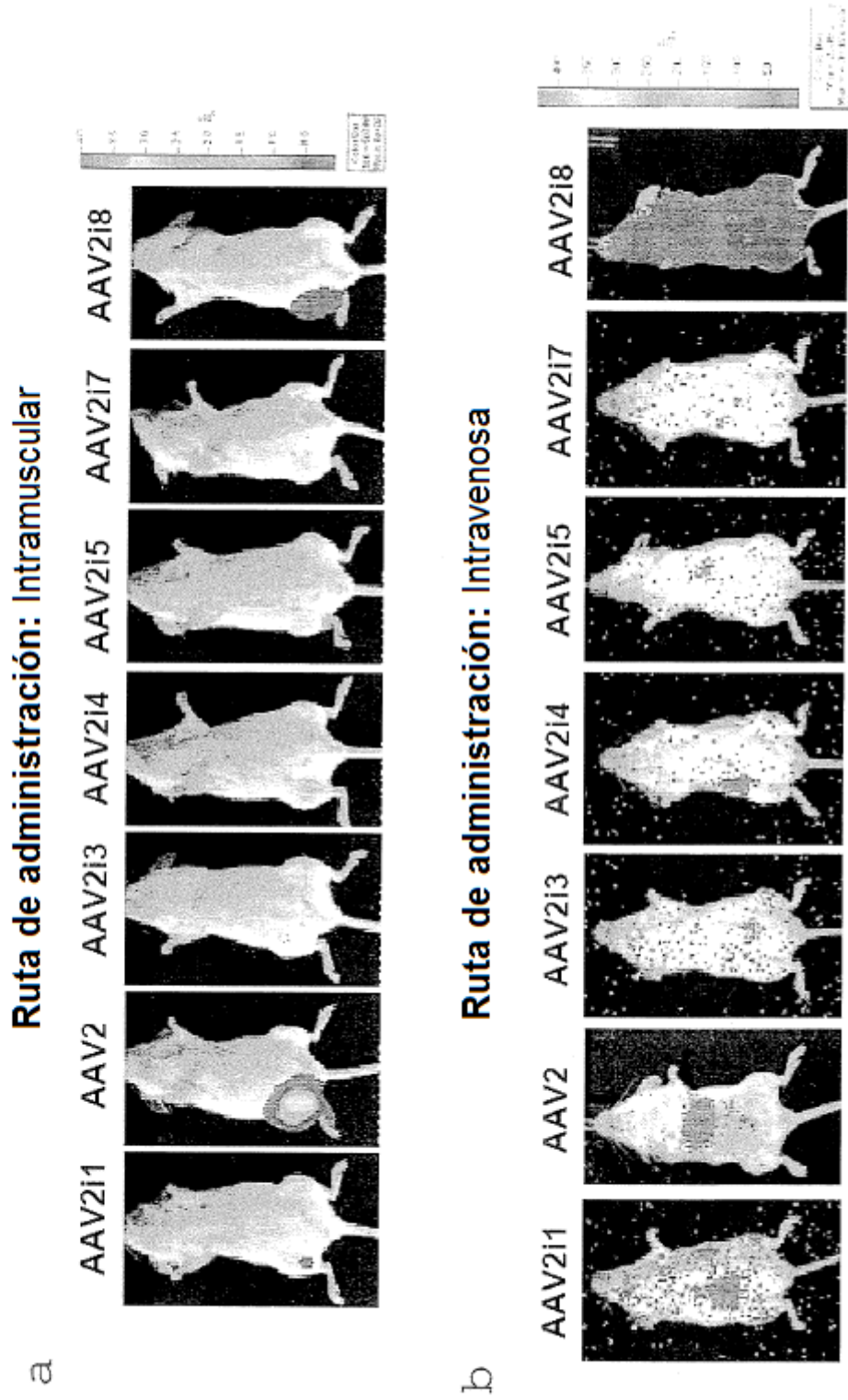


Figura 3

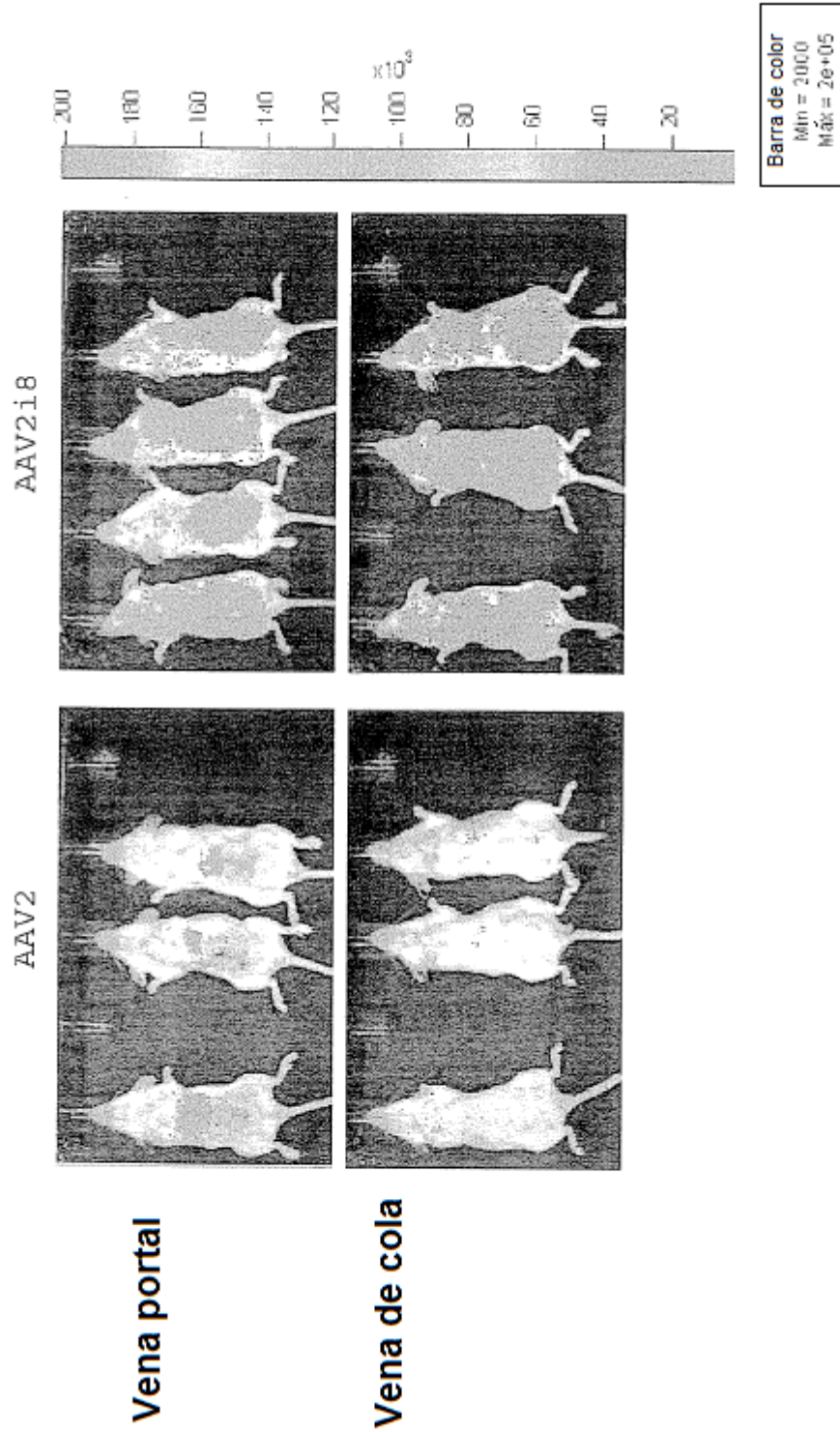


Figura 4

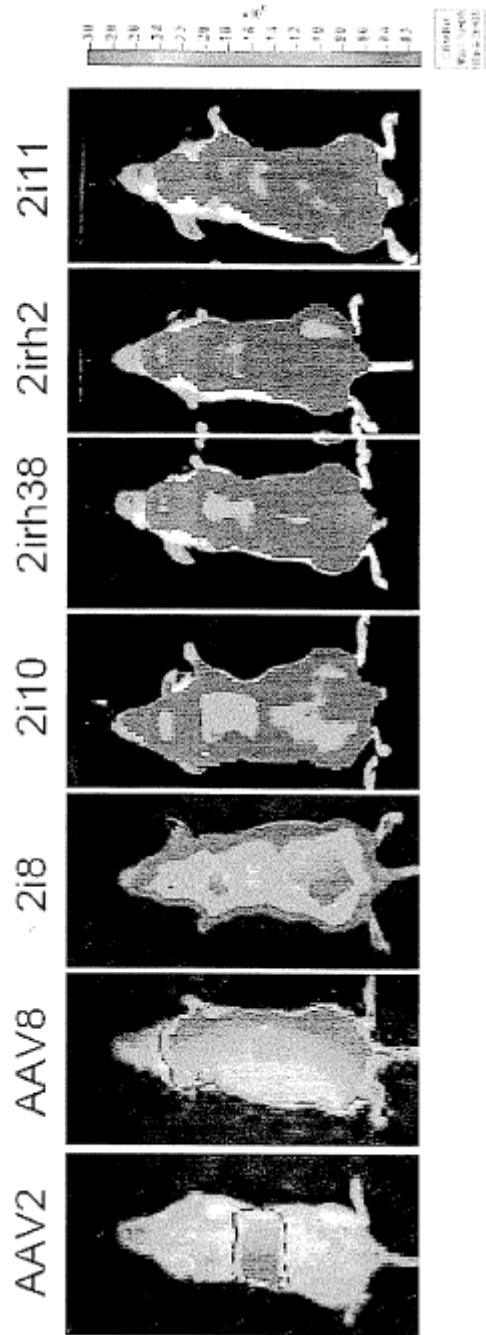


Figura 5

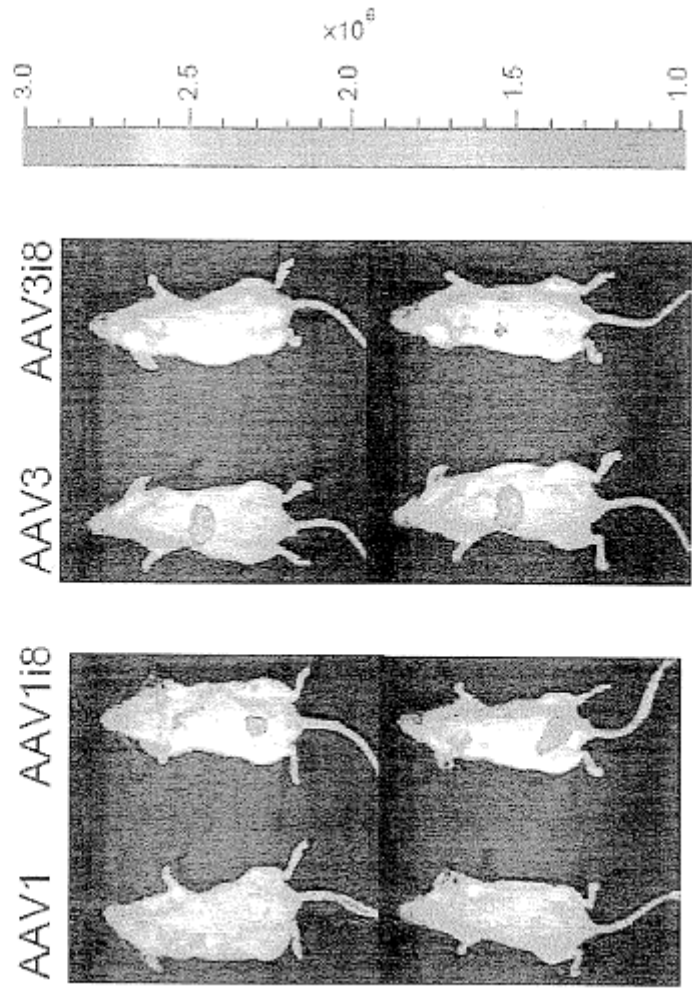


Figura 6a

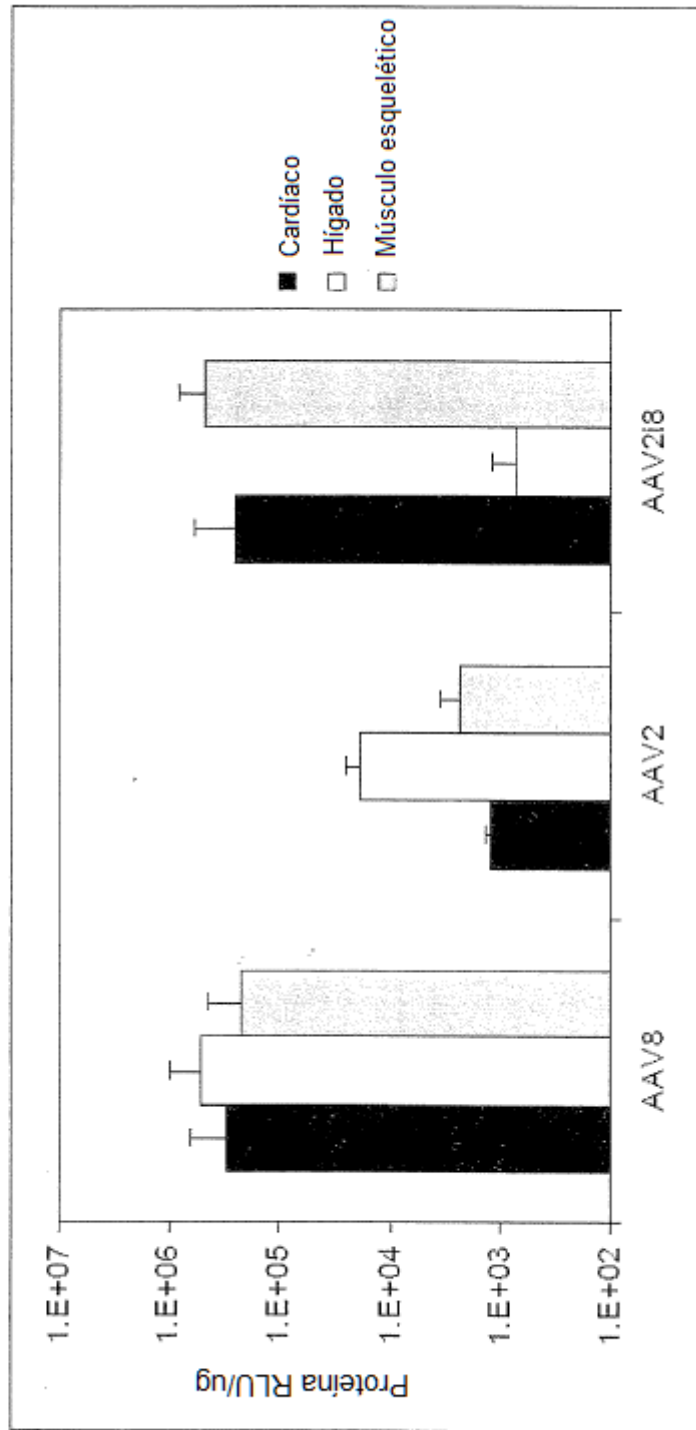


Figura 6b

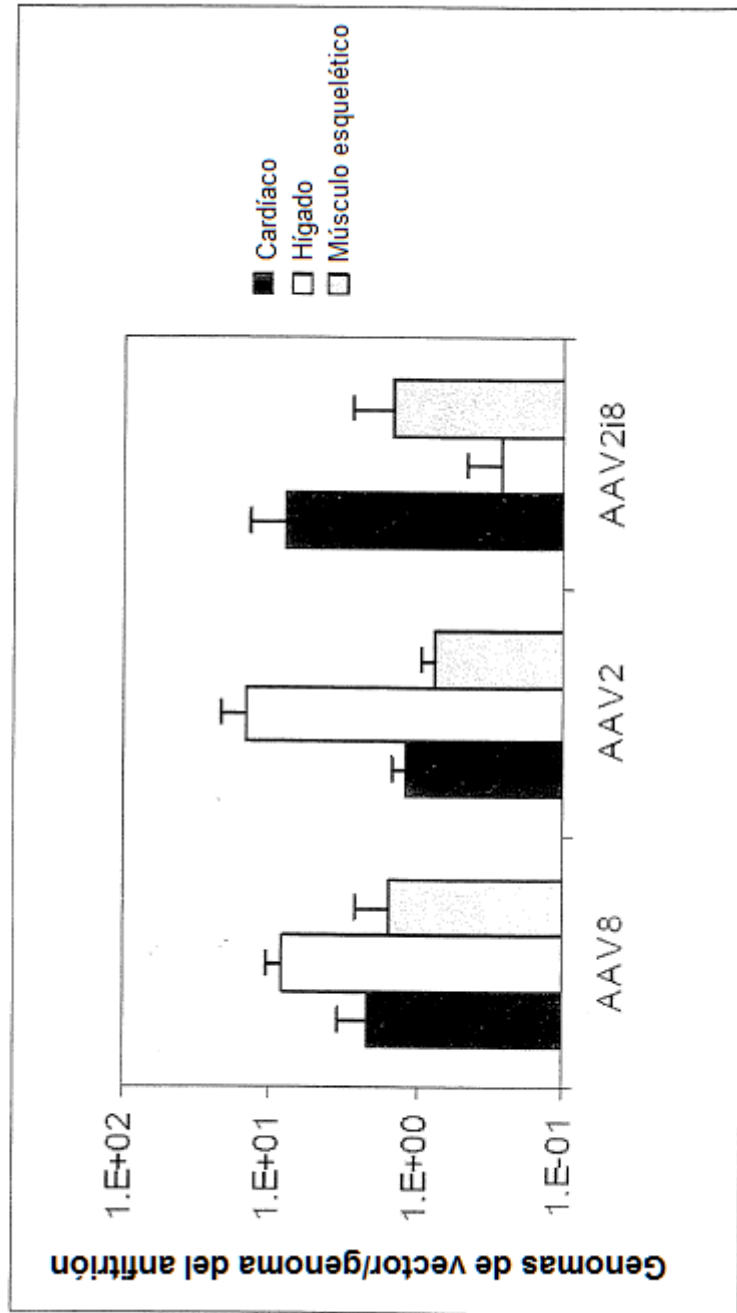


Figura 7

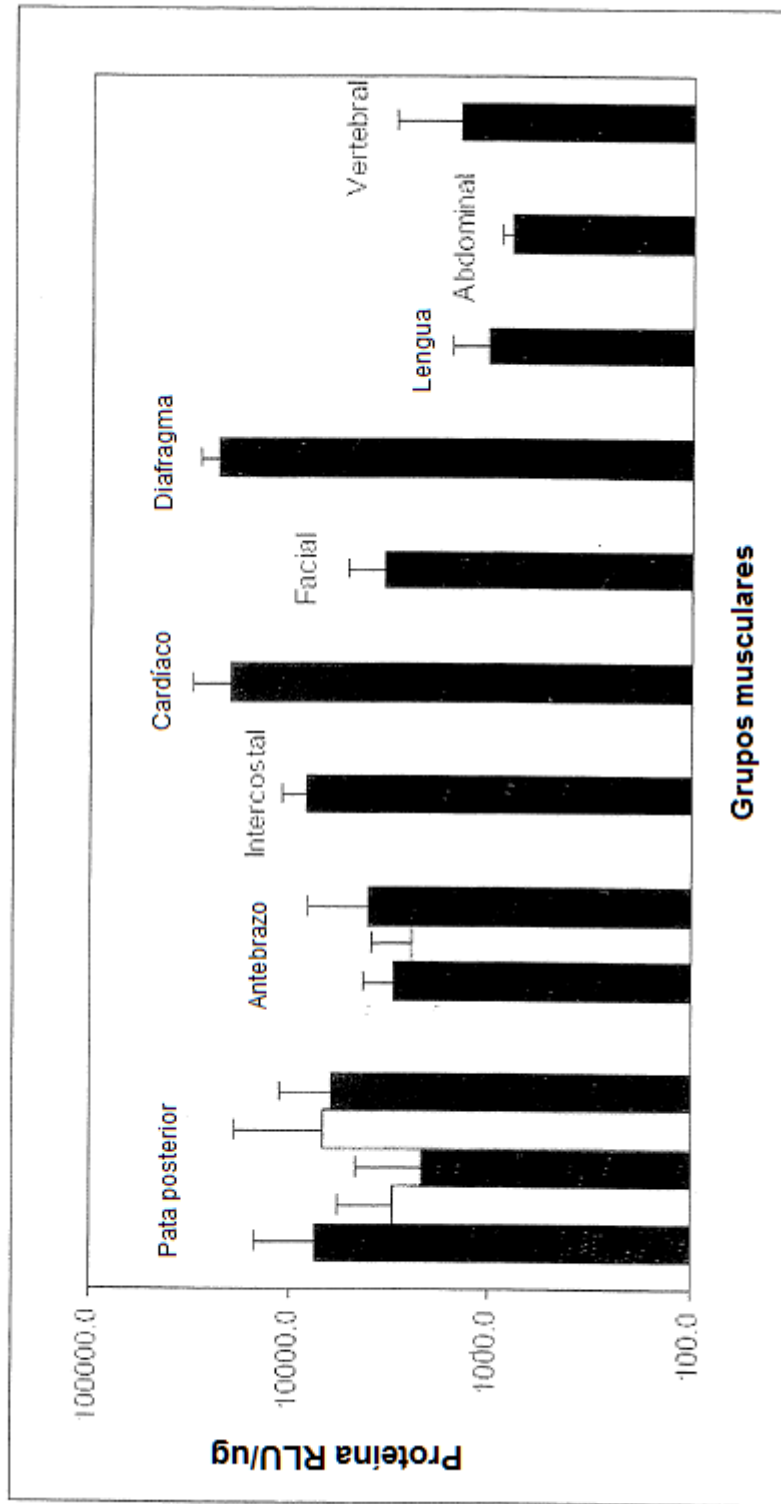


Figura 8

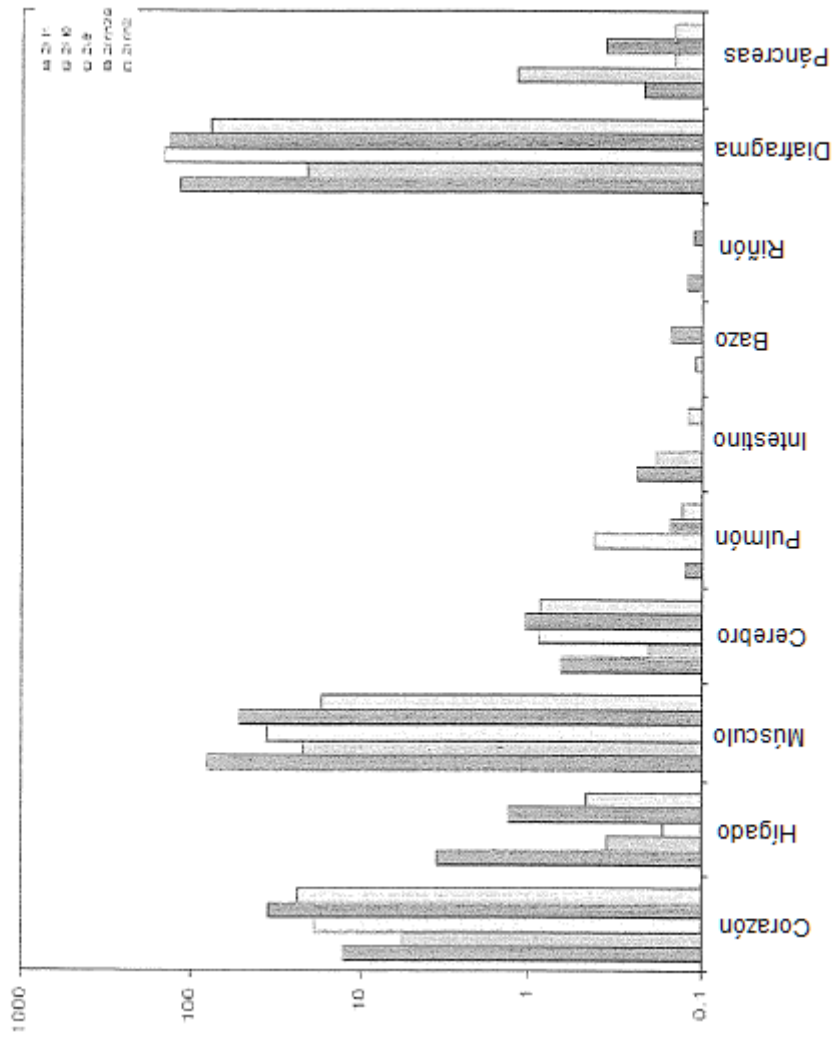


Figura 9

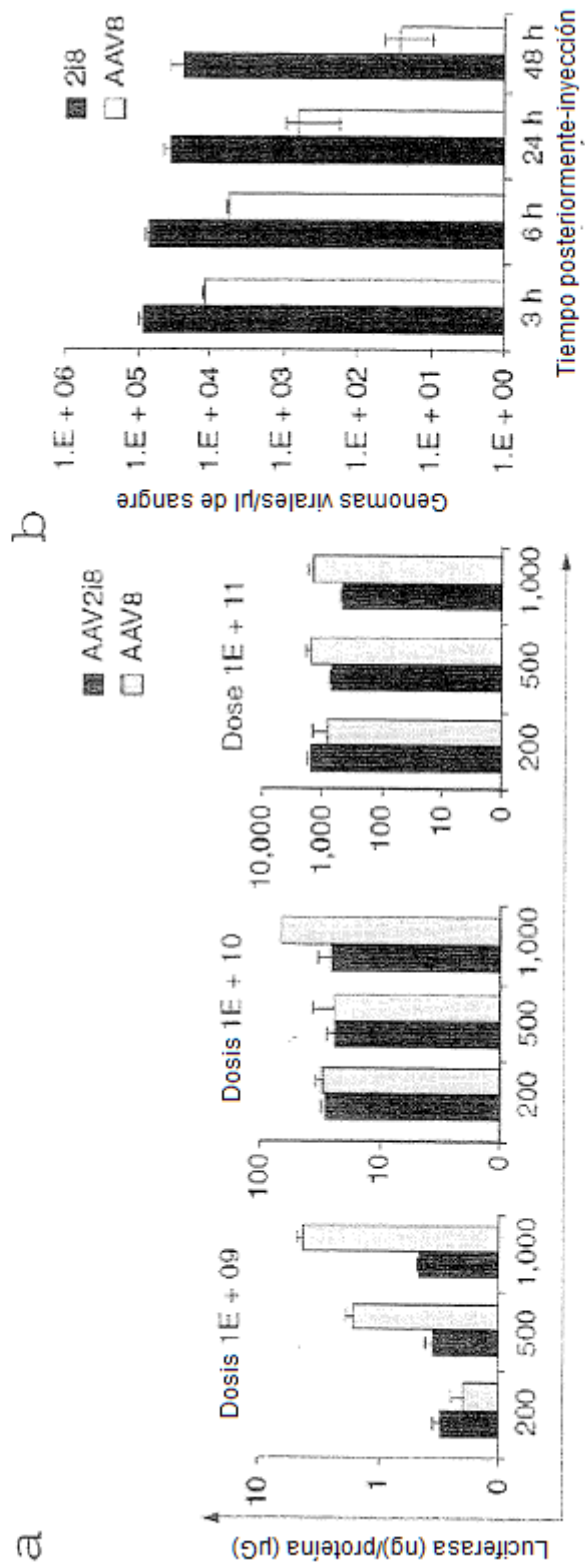


Figura 10

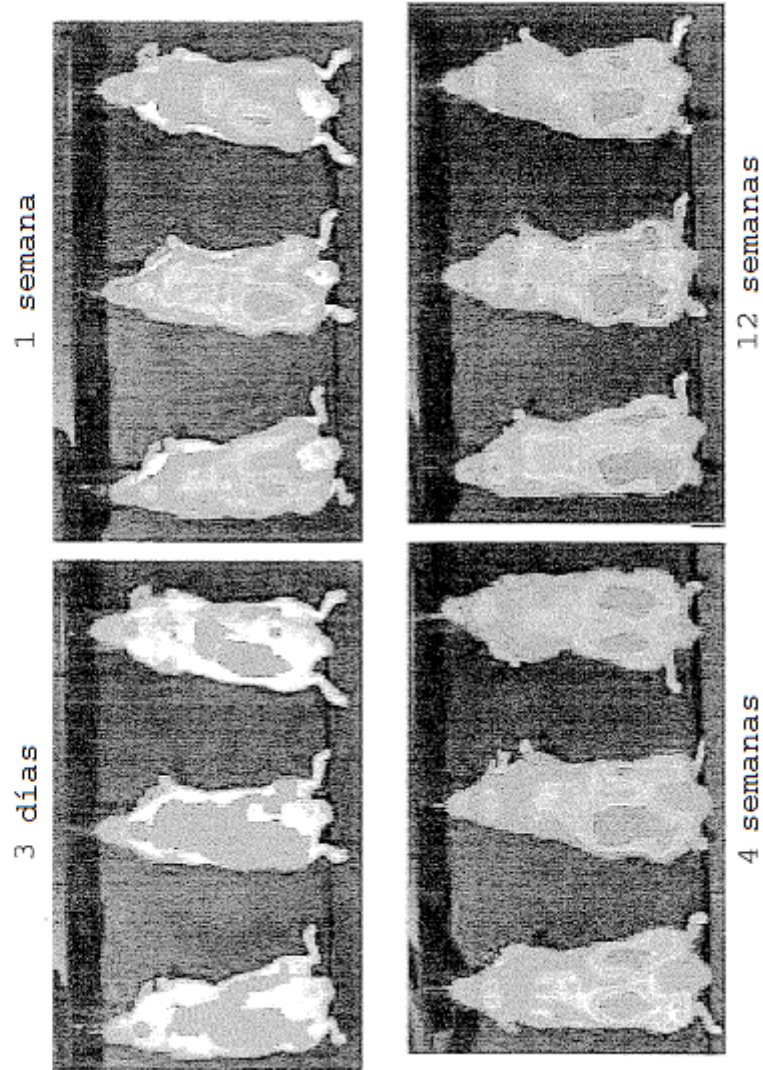


Figura 11

