

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 658 941**

51 Int. Cl.:

C12N 15/86 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.03.2013 PCT/EP2013/000656**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.09.2013 WO13131644**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.03.2013 E 13714195 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.11.2017 EP 2823048**

54 Título: **Un sistema novedoso de suministro de fármacos basado en JCV-VLP**

30 Prioridad:

06.03.2012 EP 12001507

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

13.03.2018

73 Titular/es:

**LIFE SCIENCE INKUBATOR BETRIEBS GMBH & CO. KG (100.0%)
Ludwig-Erhard-Allee 2
53175 Bonn, DE**

72 Inventor/es:

**DEMINA, VICTORIA;
MANNINGA, HEIKO;
GÖTZKE, ARMIN y
GLASSMANN, ALEXANDER**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 658 941 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

Un sistema novedoso de suministro de fármacos basado en JCV-VLP

5 Campo de la invención

La invención se refiere a partículas similares a virus (VLP) del tipo del virus del poliovirus humano para usar como sistema de suministro de fármacos.

10 Antecedentes de la invención

Uno de los mayores desafíos en la medicina moderna es el suministro de fármacos. El suministro de fármaco a un sitio de acción seleccionado (por ejemplo, un órgano, tejido, tipo celular o microcompartimento de una célula seleccionado, etc.) se denomina direccionamiento del fármaco. Mediante el direccionamiento del fármaco, es posible un aumento de la concentración del fármaco en este sitio específico incluso con una aplicación sistémica del fármaco. Adicionalmente, contrario a la aplicación sistémica ordinaria, el resto del cuerpo no se expone al fármaco o solo lo hace en una extensión inferior. Esto conduce a una reducción del riesgo de efectos secundarios adversos y puede permitir una mayor dosificación del fármaco. Además, los fármacos muy tóxicos (por ejemplo, agentes citotóxicos usados en terapias contra el cáncer) pueden aplicarse a humanos por primera vez, ya que sus efectos secundarios tóxicos se minimizan mediante el sistema de suministro de fármacos. En algunos casos, otra ventaja del direccionamiento del fármaco es la prevención de la inactivación temprana (metabolismo), la absorción no deseada, la excreción o la modificación no deseada del fármaco, ya que el fármaco se protege por el modo de suministro.

El suministro de fármacos al sistema nervioso central (CNS), en particular al cerebro, es un gran desafío, ya que los ingredientes activos en principio tienen que atravesar la barrera hematoencefálica y después tienen que alcanzar las células diana.

La barrera hematoencefálica está formada por el endotelio de los capilares. Estas células endoteliales están conectadas estrechamente entre sí por las llamadas "uniones estrechas" y con eso impiden la entrada de sustancias por encima de un determinado tamaño de peso molecular en el CNS. Por lo tanto, la barrera hematoencefálica sirve como una barrera protectora eficaz. Por un lado, garantiza el suministro de nutrientes al CNS y, por otra parte, permite la eliminación de productos metabólicos fuera del CNS.

La principal preocupación es el transporte de sustancias hidrofílicas a través de la barrera hematoencefálica. Casi el 95 % de todos los candidatos de fármacos efectivos *in vitro* no son capaces de atravesar la BBB en concentraciones farmacológicamente activas. Por lo tanto, para alcanzar concentraciones farmacológicamente adecuadas del fármaco dentro del CNS, el tratamiento de muchas enfermedades del CNS, tales como tumores cerebrales o infecciones del CNS, requiere altas concentraciones plasmáticas del fármaco. Esto incluye el riesgo de efectos secundarios adversos. Por lo tanto, en la investigación farmacéutica, se buscan formas de mejorar el transporte de fármacos, en particular los agentes hidrofílicos, en lo referente a la BBB en el CNS.

Algunos enfoques usan partículas lipofílicas, que permiten un transporte mediado por el receptor a través de la barrera hematoencefálica. Para este propósito, por ejemplo, en particular se han desarrollado sistemas de transporte de nanopartículas. Las nanopartículas generalmente se componen de polímeros y tienen un tamaño de 10-1000 nm. En su mayoría son de superficie modificada.

Estas nanopartículas a menudo enfrentan el problema de que se exportan desde el CNS mediante bombas de eflujo que se expresan en la BBB. Además, se ha demostrado que afectan la integridad de la BBB (Rempe y otros, *Biochem Bioph Res Comm* 2011, 406 (1): 64-69). Por lo tanto, la función protectora de la BBB se pone en riesgo, lo que incluye el riesgo de efectos secundarios por la entrada de sustancias indeseables o entidades infecciosas en el CNS. Esta desventaja sustancial es crítica para la aplicación clínica de nanopartículas como sistemas de suministro de fármacos.

Otros posibles sistemas de suministro de fármacos están en discusión. Por ejemplo, se conoce que las pseudocápsides de la proteína VP1 del poliovirus murino asociadas con el ADN que codifica para la β -galactosidasa pueden usarse para suministrar ese ADN en el cerebro después de la administración intravenosa, lo que lleva a la expresión de β -galactosidasa en el cerebro (Krauzewicz y otros *Gene Therapy* 2000, 7, 1094-1102; ver además, el documento WO 98/48841 A1). Sin embargo, estas observaciones no proporcionan una comprensión sólida de la idoneidad de las VLP, en particular las VLP derivadas del virus del *Poliovirus* humano y cargadas con una sustancia activa, como un sistema de suministro de fármacos para el CNS.

Por lo tanto, es un objetivo de la presente invención proporcionar un sistema de suministro de fármacos que permita el transporte de fármacos a las células del CNS, es decir, un suministro de fármacos a través de la BBB.

La capacidad del poliovirus humano JCV para atravesar la barrera hematoencefálica se conoce en la técnica, como se menciona, por ejemplo, en *J. Infection Diseases*, 202, 2010, 184-191.

Resumen de la invención

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

5 Los inventores encontraron en un modelo de BBB basado en células endoteliales primarias porcinas que las VLP de origen JCV humano cargadas con un ácido nucleico que codifica una proteína reportera pueden atravesar la BBB y suministrar el ácido nucleico a las células del CNS, donde se expresa el ácido nucleico. Este modelo se considera representativo de la BBB intacta fisiológicamente *in vivo*. Por lo tanto, esto muestra que las VLP, y no solo la sustancia activa aislada, atraviesan la BBB y entran en el CNS. Por consiguiente, las VLP derivadas del virus del *Polioma* humano y cargadas con una sustancia activa son adecuadas como un sistema de suministro de fármaco en el CNS, en particular dentro del cerebro.

15 Los inventores descubrieron, además, que el paso de las VLP cargadas no requiere ni conduce a una pérdida de la integridad o aumento de la permeabilidad de la BBB. Por lo tanto, la integridad de la BBB no se afecta sustancialmente por las VLP. Por lo tanto, las VLP pueden usarse como sistema de suministro de fármacos en el CNS sin el riesgo sustancial de efectos secundarios adversos debido a la entrada de sustancias no deseadas o de entidades infecciosas en el CNS.

20 De acuerdo con la invención, las VLP derivadas del virus del poliovirus humano y cargadas con una sustancia activa se usan para atravesar la BBB junto con la sustancia activa. De manera importante, el paso de la BBB por las VLP permite que las VLP muestren su función de dirigirse a poblaciones de células específicas dentro del cerebro, es decir, suministrar la sustancia activa a las células diana. En el contexto de la invención, dicho suministro comprende un suministro a, en, o dentro de las células diana. Por lo tanto, de acuerdo con la invención, una VLP funcional atraviesa la BBB junto con la sustancia activa.

25 La carga, preferentemente una sustancia activa, se encapsula completamente, preferentemente, en el casco de la VLP. Sin embargo, esto no excluye que la VLP pueda asociarse adicionalmente con la sustancia activa, por ejemplo, por medio de la unión de la sustancia activa a las estructuras exteriores del casco. Algunas moléculas de la sustancia activa pueden incluso encapsularse de manera incompleta dentro del casco. Sin embargo, al menos una parte de las moléculas de la sustancia activa se encapsulan completamente en el casco.

30 Se proporciona una composición de VLP derivadas del virus del poliovirus humano y una sustancia activa como un sistema de suministro de fármacos, en donde al menos 1 %, al menos 2 %, al menos 3 %, al menos 5 %, al menos 7 %, al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, con mayor preferencia al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de la cantidad total de la sustancia activa (carga) se encapsula en el casco de las VLP.

40 En una modalidad más preferida de la invención, las VLP de la composición no son agregadas. No agregado significa que las VLP pueden formar partículas separadas, cuando se suspenden en agua.

45 En un aspecto, se proporciona un sistema de suministro de fármacos para el CNS que permite un cotransporte de las VLP y la sustancia activa. El transporte puede ser activo o pasivo. Interesantemente, los inventores descubrieron, además, que las VLP no se eliminan o no se eliminan sustancialmente del CNS mediante transportadores de eflujo de la BBB.

50 Las VLP no requieren de un tratamiento de superficie o el uso de aditivos para atravesar eficientemente la BBB y entrar al CNS. Por lo tanto, en un aspecto de la descripción, se proporciona un sistema de suministro de fármacos con estructuras particuladas sin ningún tratamiento de superficie adicional o modificación, y sin el uso de aditivos. Preferentemente, el sistema de suministro de fármacos es libre de células.

55 Como se resumió anteriormente, de acuerdo con la invención, las VLP se usan para el suministro de fármacos en el CNS, en particular dentro del cerebro. El suministro en el cerebro puede permitir que un fármaco se dirija hacia las células específicas, por ejemplo, al tomar la ventaja del tropismo natural del virus del *Polioma* humano (específicamente de JCV).

Descripción detallada de la invención

60 Una partícula similar a virus (VLP) derivada del virus del poliovirus humano, en particular de JCV, que comprende preferentemente al menos una VP1, se usa para suministrar fármacos de acuerdo con la presente invención. Las VLP se componen preferentemente de un casco constituido de VP1 ensambladas en estructuras pentaméricas. Preferentemente, las VLP se componen de diversas VP1, en particular de diversos pentámeros de VP1, especialmente 72 pentámeros de VP1. Sin embargo, las VLP pueden comprender opcionalmente moléculas adicionales incorporadas en el casco. Las moléculas de la estructura que ensamblan las VLP pueden ser o bien idénticas a las proteínas nativas del virus del *Polioma* o pueden modificarse para optimizar las características de VLP.

Adicionalmente, las VLP comprenden, además, una sustancia activa. En una modalidad preferida particular de la invención, la mayor parte de la cantidad total de la sustancia activa se incorpora completamente en el casco. Para describir la encapsulación completa de la molécula de sustancia activa por la VLP, se usa el término "cargada". Por lo tanto, una "VLP cargada" es una VLP con una sustancia activa encapsulada completamente.

Dicha sustancia activa puede ser cualquier molécula o composición que se ajuste dentro del espacio rodeado por el casco. Preferentemente, la sustancia activa es un agente citotóxico, un agente detectable tal como un radionúclido, una proteína, un péptido o un ácido nucleico, en particular seleccionado del grupo que consiste en ácidos nucleicos que codifican una proteína deseada tal como ARNm, ADNc, un plásmido o vector, ácidos nucleicos inhibidores tales como siRNA o miRNA y ácidos nucleicos que tienen actividad catalítica tal como una ribozima. La carga se denomina algunas veces en lo sucesivo como la "sustancia activa", "sustancia farmacológica" o "ingrediente activo". Siempre que no se mencione explícitamente de cualquier otra manera, estos términos se usan como sinónimos.

Las VLP pueden producirse mediante la provisión de los componentes deseados, en particular VP1, opcionalmente VP2, opcionalmente VP3 o una mezcla de estos y opcionalmente la sustancia activa, en solución y al permitir que los componentes se ensamblen en la VLP. Por ejemplo, la mezcla de los componentes puede realizarse en condiciones donde no se produce un ensamblaje de VLP u ocurre un ensamblaje limitado, tal como como a bajas concentraciones de Ca^{2+} y/o condiciones reductoras, y después de la adición de todos los componentes deseados las condiciones cambian a aquellas que son favorables para el ensamblaje de VLP, tales como concentraciones más altas de Ca^{2+} y/o condiciones oxidantes. Sin embargo, la producción de VLP, además, puede ocurrir in vivo. En particular, los componentes de las VLP pueden coexpresarse en una célula hospedera y las VLP se ensamblan dentro de la célula hospedera o en el momento de la lisis o de la ruptura de la célula hospedera.

El término "virus del polio humano" se refiere a la familia del virus del polio humano, que comprende JCV, BK y SV40. En una modalidad particularmente preferida, el virus del polio humano es JCV.

"VP1" o "proteína de virus 1" se refiere a una proteína que es idéntica a, o se deriva de la VP1 natural del virus JC que tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 1. Una proteína derivada de la VP1 natural del virus JC, preferentemente, tiene una homología o identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 1 de al menos 60 %, con mayor preferencia al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % en una secuencia de al menos 100 aminoácidos contiguos, preferentemente al menos 150, al menos 200, al menos 250 o al menos 300 aminoácidos contiguos. Más preferentemente, la homología o identidad de los aminoácidos se calcula en toda la longitud del JCV-VP1 natural. Los términos "VP1 derivada de la VP1 natural del virus JC" y "VP1 derivada del virus JC" en particular incluyen, además, la VP1 que es idéntica a la VP1 natural del virus JC.

El término "VP1" abarca, además, fracciones y derivados de la VP1 natural que son capaces de ensamblarse en VLP. Preferentemente, dichas fracciones y derivados de VP1 comprenden al menos los aminoácidos 32 a 316 de la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 1 o un derivado de esta que tiene una homología o identidad con la secuencia de aminoácidos desde la posición de aminoácidos 32 hasta 316 de la sec. con núm. de ident.: 1 de al menos 60 %, con mayor preferencia al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % en una secuencia de al menos 100 aminoácidos contiguos, preferentemente al menos 150, al menos 200, al menos 250 o al menos 300 aminoácidos contiguos, preferentemente en la secuencia completa.

Una VP1 puede incluir, además, una señal de localización nuclear heteróloga (NLS). Preferentemente, esta NLS se introduce delante o en el extremo N-terminal de NP1, en particular en los primeros 30, los primeros 25, los primeros 20, los primeros 15 o los primeros 10 aminoácidos de VP1. Por ejemplo, una NLS como se describió en el documento WO 2009/036933 (por ejemplo, página 10, líneas 4 a 13 y Figura 4A) o en Shishido-Hara y otros (Shishido-Hara, Y., Hara, Y., Larson, T., Yasui, K., Nagashima, K. & Stoner, G.L. Analysis of Capsid Formation of Human Polyomavirus JC (Tokyo-1 Strain) by a Eukaryotic Expression System: Splicing of Late RNAs, Translation and Nuclear Transport of Major Capsid Protein VP1, and Capsid Assembly. Journal of Virology 74, 1840-1853 (2000).

De acuerdo con un aspecto, la secuencia de aminoácidos según la sec. con núm. de ident.: 5 se introduce en parte del extremo N-terminal de VP1, en particular entre los aminoácidos correspondientes a los aminoácidos 9 y 10 de la sec. con núm. de ident.: 1.

"VP2" o "proteína de virus" se refiere a una proteína que es idéntica o se deriva de la VP2 natural del virus JC que tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 3. Una proteína derivada de la VP2 natural del virus JC, preferentemente, tiene una homología o identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 3 de al menos 60 %, con mayor preferencia al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % en una secuencia de al menos 100 aminoácidos contiguos, preferentemente al menos 150, al menos 200, al menos 250 o al menos 300 aminoácidos contiguos. Más preferentemente, la homología o identidad de aminoácidos

se calcula en toda la longitud del JCV-VP2 natural. Los términos "VP2 derivado del VP2 natural del virus JC" y "VP2 derivado del virus JC" en particular incluyen, además, VP2 que es idéntica a la VP2 natural del virus JC.

5 El término "VP2" abarca, además, fracciones y derivados de la VP2 natural que son capaces de ensamblarse en VLP junto con VP1. Preferentemente, dichos fragmentos de VP2 al menos comprenden los aminoácidos 214 a 318 de la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 3 o un derivado de esta que tiene una homología o identidad con la secuencia de aminoácidos desde la posición de aminoácidos 214 a 318 de la sec. con núm. de ident.: 3 de al menos 60 %, con mayor preferencia al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % en una secuencia de al menos 100 aminoácidos contiguos, preferentemente al menos 150, al menos 200, al menos 250 o al menos 300 aminoácidos contiguos, preferentemente en la secuencia completa.

15 Un "péptido" de acuerdo con la presente invención puede componerse de cualquier número de aminoácidos de cualquier tipo, preferentemente de los aminoácidos que existen en la naturaleza, que preferentemente se unen mediante enlaces peptídicos. En particular, un péptido comprende al menos 3 aminoácidos, preferentemente al menos 5, al menos 7, al menos 9, al menos 12 o al menos 15 aminoácidos. Además, no hay un límite superior para la longitud de un péptido. Sin embargo, preferentemente un péptido de acuerdo con la invención no excede una longitud de 500 aminoácidos, preferentemente 300, 250, 200, 150 o 120 aminoácidos.

20 La expresión "comprende", como se usa en la presente descripción, además de su significado literal incluye además, y se refiere específicamente a las expresiones "consisten esencialmente en" y "consisten en". Por lo tanto, la expresión "comprende" se refiere a modalidades en donde el sujeto que "comprende" los elementos enumerados específicamente no comprende elementos adicionales así como también modalidades en donde el sujeto que "comprende" los elementos enumerados específicamente puede y/o verdaderamente abarca elementos adicionales. Igualmente, la expresión "tiene" debe entenderse como la expresión "comprende", que incluye además, y se refiere específicamente a las expresiones "consisten esencialmente en" y "consisten en".

Métodos de administración

30 Las VLP pueden administrarse a través de diversas rutas. Particularmente, las formas de dosificación preferidas son las que permiten un efecto sistémico de la sustancia activa. Las formas de dosificación más preferidas son las que se suministran por vía oral o parenteral, en particular por vía intravenosa.

Métodos de fabricación

35 *Fabricación de partículas similares a virus*

En un aspecto adicional, la presente descripción proporciona un método para producir las partículas similares a virus de acuerdo con la presente descripción. Este método comprende en particular las etapas de

40 (a) proporcionar una proteína viral VP1 que se deriva del virus JC;
 (b) proporcionar opcionalmente una proteína viral VP2 y/o VP3, preferentemente VP2, que se deriva del virus JC y mezclar la VP1 con la VP2 (y/o VP3);
 (c) permitir que la VP1 y opcionalmente la VP2 (y/o VP3) se ensamblen en partículas similares a virus.

45 Adicionalmente, el método comprende preferentemente la etapa de proporcionar una sustancia activa y mezclar la VP1 y opcionalmente la VP2 y/o VP3 con la sustancia activa. Se prefiere una mezcla entre VP1 y VP2.

50 En el momento de ensamblar las VLP, la sustancia activa se encapsula, preferentemente, dentro de la VLP. Preferentemente, al menos una VLP porta una sustancia activa, con mayor preferencia al menos 1 %, al menos 2 %, al menos 3 %, al menos 5 %, al menos 7 %, al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % o 100 % de las VLP ensambladas portan una sustancia activa.

55 El ensamblaje de las partículas similares a virus se produce, preferentemente, en solución, más preferentemente en una solución acuosa. Permitir el ensamblaje de la VLP incluye, preferentemente, ajustar la concentración de iones de Ca^{2+} en la solución a un nivel donde puede ocurrir el ensamblaje de VLP. En particular, dicha concentración de iones Ca^{2+} está en el intervalo de 0,1 mM a 5 mM, preferentemente, de 0,2 mM a 3 mM, con mayor preferencia de 0,5 mM a 2 mM o de 0,8 mM a 1,2 mM, con la máxima preferencia alrededor de 1 mM. Adicionalmente, permitir el ensamblaje de las VLP preferentemente ocurre en condiciones oxidantes, en particular en ausencia de concentraciones significativas de agentes reductores tales como DTT, DTE o mercaptoetanol.

60 Pueden realizarse simultáneamente la provisión de las proteínas virales y permitir el ensamblaje de las VLP. En particular, las proteínas virales se proporcionan en condiciones donde puede ocurrir el ensamblaje de las VLP. En aspectos preferidos, la provisión de las proteínas virales y el ensamblaje de las VLP se realizan in vivo. En particular, las

VLP se ensamblan dentro de las células hospederas que expresan las proteínas virales o en el momento de la lisis o la ruptura de las células hospederas.

El ensamblaje de las VLP puede realizarse, por ejemplo, como se describió en el documento EP 0 862 633.

5

Métodos de suministro

La presente descripción proporciona, además, un método para suministrar una sustancia o composición a una célula diana en el sistema nervioso central mediante el uso de las partículas similares a virus de acuerdo con la descripción. El método comprende, preferentemente, las etapas de

10

(a) proporcionar una partícula similar a virus que comprende la sustancia o composición como sustancia activa; y
(b) administrar la partícula similar a virus en el cuerpo vivo, preferentemente en un humano.

15

La célula diana puede ser una célula diana natural del virus JC.

La sustancia o composición activa puede ser de cualquier tipo o naturaleza. En una modalidad preferida, la sustancia activa es un ácido nucleico, en particular un ácido nucleico que codifica una proteína o péptido o un ácido nucleico inhibidor tal como siRNA o miRNA. En otra modalidad preferida, la sustancia activa es una proteína o péptido. En aún otro aspecto, la sustancia activa es una molécula pequeña, en particular una molécula pequeña cargada negativamente. La sustancia activa puede ser, además, una mezcla de diversas sustancias activas.

20

La sustancia activa es, preferentemente, un agente citotóxico.

25

Además, la descripción se refiere a VLP en general, que pueden usarse como un sistema de suministro de fármacos para el tratamiento o diagnóstico de trastornos neurológicos, neuronales o neurodegenerativos tales como, en particular, esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson o enfermedad de Alzheimer.

En un aspecto preferido, la VLP se transporta en, hacia o dentro de los oligodendrocitos.

30

Ejemplos

1. VP1-VLP en el modelo *in vitro* de barrera hematoencefálica (BBB)

35

Este experimento *in vitro* muestra la capacidad de las VLP para atravesar la BBB en un sistema modelo que coincide con la organización y las propiedades de la BBB humana. En el sistema modelo, se usaron células endoteliales cerebrales primarias porcinas (PBCEC) que son capaces de formar la barrera hematoencefálica *in vitro* (Angelow S, Zeni P y Galla HJ "Usefulness and limitation of primary cultured porine choroid plexus epithel cells as an *in vitro* model to study drug transport at the blood-CSF barrier", *Adv Drug Delivery* 2004; 56(12): 1859-73).

40

La preparación y el cultivo de las PBCEC se realizó como se describió por Rempe y otros, *BBRC*, 2011: Transporte de nanopartículas de Poli-(n-butilciano-acrilato) a través de la barrera hematoencefálica *in vitro* y su influencia en la integridad de la barrera.

45

El efecto de las VLP que contienen sustancia activa sobre las PBCEC en el sistema de filtro insertado en el pocillo se exploró con la ayuda de la *medición de la resistencia eléctrica transendotelial relativa (TEER)* (Rempe y otros, 2011). Para establecer una prueba cuantitativa del suministro, usamos un plásmido de ADN como sustancia activa. La integridad de la barrera hematoencefálica no se afectó por la VP1-VLP en ninguna circunstancia y concentración.

50

Para verificar el transporte de la sustancia activa a través de la barrera hematoencefálica *in vitro*, el plásmido de ADN se empaquetó en las VLP como se describió en Goldmann y otros, 1999 (*Journal of Virology: Molecular cloning and expression of major structural protein VP1 of the human polyoma virus: formation of virus like particles useful for immunological and therapeutic studies and measured quantitatively by specific qPCR*). Las copias del plásmido de ADN se cuantificaron en los lados apical y basolateral en el modelo de BBB *in vitro*. El lado apical es donde se agregaron las VLP (la luz del vaso sanguíneo *in vivo*), el lado basolateral se refiere al cerebro. La prueba cuantitativa del plásmido de ADN en el lado basolateral representa el paso de las moléculas a través de las células endoteliales del cerebro, mediado por las VLP, en consecuencia, el suministro de la sustancia activa a través de la barrera hematoencefálica.

55

2. Suministro y expresión del gen reportero *in vivo*

60

Se *planearon experimentos de suministro del gen reportero* para mostrar las capacidades de JC VP1-VLP para suministrar las sustancias en las células y órganos en el organismo vivo. En este caso, la expresión del gen reportero es uno de los mejores métodos para demostrar no solo el suministro, sino también la funcionalidad de la sustancia suministrada (Hoffman, R.M., 2005: THE MULTIPLE USES OF FLUORESCENT PROTEINS TO VISUALIZE CANCER IN VIVO. *Nat. Rev. Cancer*; 5(10):796-806).

65

Materiales

5 Se evaluaron sondas deferentes de VP1-VLP sobre la capacidad de empaquetar y suministrar el plásmido reportero en células Cos7 (células de riñón de mono verde) *in vitro*, ya que se conoce que esta línea celular es transducible por JCV VLP. Había 9 sondas de VP1-VLP precipitadas con sales y 15 sondas de VP1-VLP purificadas por cromatografía. Los experimentos de transducción *in vitro* se repitieron 5 veces. En estos experimentos se evaluaron la capacidad para transmitir la máxima señal de luminiscencia con los sustratos de luciferina durante los experimentos *in vivo*.

10 Las VP1-VLP precipitadas con sales se precipitaron toda la noche y se dializaron 24 horas contra el tampón estándar (NaCl 150mM, Tris-HCl pH7.5 10mM). El empaquetamiento del plásmido del gen reportero se logró por disociación química y reasociación como se describió en Goldmann y otros, 1999, Journal of Virology: Molecular cloning and expression of major structural protein VP1 of the human polyoma virus: formation of virus like particles useful for immunological and therapeutic studies.

15 *El diseño experimental*

La inyección intravenosa de las VLP en ratones BALB/c inmunocompetentes se realizó en la vena de la cola bajo anestesia con isofluorano.

20 Los animales se agruparon de la siguiente manera:

- 5 µg de VLP precipitadas con sales (4 animales)
- 50 µg de VLP precipitadas con sales (4 animales)
- 5 µg de VLP purificadas por cromatografía (4 animales)
- 25 - Control de ADN (solo el plásmido del gen reportero) (3 animales)
- Control de VLP (solo cápsides de VP1-VLP) (3 animales)

30 La bioluminiscencia se midió los días 2, 4, 7, 14 y 22, 12 minutos después de la inyección intraperitoneal del sustrato de Luciferina. Los resultados se agruparon en cada grupo y se calcularon el promedio y la desviación estándar. Los promedios se analizaron con ANOVA de dos vías, con Holm-Sidak como prueba post hoc.

Los resultados se muestran en las Figuras 3 y 4.

35 3. Eficacia de transducción de células Cos7 (células de riñón de mono verde africano) con ayuda de JC VP1-VLP cargadas con los plásmidos de *Luciferasa* y JC VP1-VLP mezcladas con plásmidos de *Luciferasa*

1. 18 horas antes de la transducción, las células Cos7 se pasaron a la placa de 24 pocillos.

40 2. Las VP1-VLP se disociaron con DTT y EGTA, se mezclaron con el plásmido de *Luciferasa* y se dializaron frente al tampón de reasociación durante toda la noche a +4°C.

3. Al día siguiente, las VP1-VLP empaquetadas se sacaron de la diálisis.

45 4. Las VP1-VLP mezcladas con el plásmido de *Luciferasa* se prepararon de acuerdo con Krauzewicz (Gene Therapy (2000) 7, 1094-1102):

- a. La relación de la mezcla de VLP con respecto al plásmido de *Luciferasa* fue de 30:1 (w/w)
- b. Esta mezcla se incubó 15 minutos a TA
- 50 c. Las mezclas se diluyeron con medio celular DMEM y se pipetearon sobre las células Cos7 en una placa de 24 pocillos.

5. Las VP1-VLP empaquetadas con el plásmido de *Luciferasa* se pipetearon sobre las células Cos7; lo mismo se realizó con las VP1-VLP mezcladas con plásmido de *Luciferasa*.

55 6. Después de 72 horas, las células se lisaron y la actividad de la luciferasa se midió por triplicado con la ayuda del ensayo de luciferasa de Promega.

Los resultados de los experimentos de transducción independientes se muestran en la Figura 5

60 4. Detección inmunohistoquímica de luciferasa y proteína VP1 en el cerebro de ratón después de la aplicación intravenosa de las VLP empaquetadas con un plásmido de luciferasa

65 Como se mostró anteriormente, las JC VP1-VLP son capaces de suministrar sustancias en las células y órganos en el organismo vivo como se demostró por la detección del ADN del plásmido (por qPCR) o la actividad de luciferasa. Estos resultados experimentales se soportan adicionalmente por la detección inmunohistoquímica de la proteína *Luciferasa* y la proteína VP1 en el cerebro.

Se aislaron tejidos cerebrales de ratones con una inyección intravenosa de VLP en ratones BALB/c inmunocompetentes (tratamiento como se describió anteriormente), se fijaron en PFA y se incluyeron en parafina como se describió en (J. Jankowski y otros, *The Journal of comparative Neurology* 472: 87-99, 2004: "Engrailed-2 negatively regulates the onset of prenatal Purkinje Cell differentiation"). Se cortaron secciones finas de 7 a 10 μm y se montaron en portaobjetos Histobond plus. Las secciones se rehidrataron, se inactivó la peroxidasa endógena y las secciones se permeabilizaron. Se realizó una etapa de bloqueo en solución de albúmina de suero bovino al 3 %. La proteína luciferasa o la proteína VP1, respectivamente, se detectaron con anticuerpos monoclonales. Para aumentar la intensidad de la señal, se usó el sistema fluorescente de amplificación TSA (Sistema de Fluoresceína Plus TSA™, Perkin Elmer).

Resultados: Como se muestra en el panel derecho de la Figura 6B, el análisis inmunohistoquímico mediante el uso del anticuerpo anti-VP1 fue capaz de detectar la proteína VP1 en células del CNS. La porción del cerebro muestra manchas dispersas de tamaño irregular, que es indicativo de una localización celular de VP1 dentro del parénquima cerebral. Mediante el uso del anticuerpo anti-luciferasa, además, podría detectarse la proteína luciferasa en células del CNS. De acuerdo con los resultados para la proteína VP1, además, la tinción derivada de luciferasa de la porción de cerebro muestra manchas dispersas de tamaño irregular, que es indicativo de una localización celular de luciferasa dentro del parénquima cerebral.

Discusión: La presencia celular de la luciferasa y la proteína VP1 en el cerebro representan un soporte adicional del concepto básico de la invención, porque demuestra que las VLP, y no solo la sustancia activa aislada, atraviesan la BBB y entran en el CNS.

5. El análisis de colocalización revela la presencia de la proteína VP1 en oligodendrocitos.

En base a la detección celular descrita anteriormente de la proteína VP1 en el CNS, se realizó un experimento de colocalización para identificar las células diana respectivas. Para este propósito, la proteína VP1 detectada se colocalizó con el marcador Olig 2, que se localiza específicamente en oligodendrocitos (B. Menn y otros, "Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain", *The Journal of Neuroscience*, 2006, 26(30): 7907-7918).

Resultados: Como se muestra en el panel inferior izquierdo de la Figura 8, mediante el uso del marcador Olig2 pudieron detectarse varias manchas irregulares en la porción del cerebro, que en todos los casos se tiñeron, además, con la tinción del núcleo DAPI (panel izquierdo superior de la Figura 8) y, por lo tanto, indicativo de oligodendrocitos. Cada uno de estos oligodendrocitos es positivo, además, para la proteína VP1 como se muestra en el panel inferior derecho de la Figura 8. Las células que son positivas para Olig2 y VP1 están marcadas con una flecha blanca. Por lo tanto, la proteína VP1 se localiza en oligodendrocitos del CNS, lo que es indicativo de una infección de estas células por las VLP aplicadas por vía intravenosa.

Discusión: La detección de la proteína VP1 en los oligodendrocitos del cerebro está en línea con el tropismo natural del virus JCV. Como un resultado, las VLP reivindicadas de la invención son especialmente adecuadas para un tratamiento terapéutico de enfermedades asociadas con oligodendrocitos tal como la esclerosis múltiple.

Leyenda:

Figura 1: A, B- Desarrollo de resistencia eléctrica transendotelial relativa (A y B) después de la adición de VP1-VLP en concentraciones entre 5×10^8 y 2×10^{12} partículas por pocillo (n=3).

Figura 2: Paso de las VP1-VLP cargadas con ADN a través de la barrera hematoencefálica en el modelo *in vitro*, medido con qPCR con cebadores específicos. *VLP añadidas*- el número de las VLP añadidas sobre el lado apical en el modelo de BBB, *VLP detectadas*- número de plásmidos detectado sobre los lados apical y basolateral en el modelo de BBB (n=3)

Figura 3: Señales bioluminiscentes en el cuerpo de los ratones después de la aplicación intravenosa: 5 μg de VLP precipitadas con sales; 50 μg de VLP precipitadas con sales; 5 μg de VLP purificadas por cromatografía; Control de ADN (solo el plásmido del gen reportero); Control de VLP (solo las cápsidas de VP1-VLP). Como ejemplos, 1 ratón de cada grupo sobre el lado ventral y dorsal.

Figura 4: Señales bioluminiscentes en las cabezas de los ratones después de la aplicación intravenosa: 5 μg de VLP precipitadas con sales; 50 μg de VLP precipitadas con sales; 5 μg de VLP purificadas por cromatografía; Control de ADN (solo el plásmido del gen reportero). Los resultados promedio en los grupos menos el control de VLP (como señal de fondo).

Figura 5: A, B: Transducción de las células Cos7 con ayuda de VP1-VLP, cargadas con el ADN del plásmido de Luciferasa. RLU -Unidades de Luz Relativa; 25 μg de VLP empaquetadas - 25 μg de JC VP1-VLP empaquetadas con plásmido de *Luciferasa*; 50 μg de VLP empaquetadas - 50 μg JC VP1-VLP empaquetadas con el plásmido de *Luciferasa*; 50 μg VLP mezcladas - 50 μg JC VP1-VLP mezcladas con el ADN del plásmido de *Luciferasa*; Control de ADN - Control del plásmido de *Luciferasa*.

Figura 6: Análisis inmunohistoquímico de las secciones cerebrales. La columna izquierda muestra la tinción DAPI del núcleo celular, la columna derecha las proteínas fluorescentes marcadas: A- control negativo; B- FITC-tinción fluorescente de la proteína VP1; C- FITC-tinción fluorescente de la proteína luciferasa.

5

Figura 7: Controles negativos para la colocalización de la proteína VP1 con el marcador de oligodendrocitos Olig2. El panel superior izquierdo muestra la tinción de los núcleos de la célula con el colorante DAPI. El panel superior derecho muestra la señal después de la detección de fluorescencia sin el uso del anticuerpo anti-VP1. El panel inferior izquierdo muestra la señal después de la detección de fluorescencia sin usar el anticuerpo anti-Olig2. El panel inferior derecho representa las imágenes fusionadas de las dos manchas del control.

10

Figura 8: Colocalización de la proteína VP1 con el marcador de oligodendrocitos Olig2. El panel superior izquierdo muestra la tinción de los núcleos de la célula con el colorante DAPI. El panel superior derecho muestra la localización de la proteína VP1 (FITC-fluorescencia). El panel inferior izquierdo muestra la tinción con el anticuerpo anti-Olig2 (TRITC-fluorescencia). El panel inferior derecho representa las imágenes fusionadas de la tinción para el marcador Olig2 y la proteína VP1.

15

Listado de secuencias

<110> Life Science Inkubator Betriebs GmbH & Co. KG

5 <120> Un sistema novedoso de suministro de fármacos basado en JCV-VLP

<130> 54 311 K

<160> 5

10 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 354

<212> PRT

15 <213> Virus del polioima JC

<220>

<221> CARACT-MISCELÁNEAS

<222> (1)..(354)

20 <223> proteína de la cápside VP1

<220>

<221> CARACT-MISCELÁNEAS

<222> (10)..(10)

25 <223> xaa es Pro o Arg

<400> 1

```

Met Ala Pro Thr Lys Arg Lys Gly Glu Xaa Lys Asp Pro Val Gln Val
1          5          10
Pro Lys Leu Leu Ile Arg Gly Gly Val Glu Val Leu Glu Val Lys Thr
20         25         30
Gly Val Asp Ser Ile Thr Glu Val Glu Cys Phe Leu Thr Pro Glu Met
35         40         45
Gly Asp Pro Asp Glu His Leu Arg Gly Phe Ser Lys Ser Ile Ser Ile
50         55         60
Ser Asp Thr Phe Glu Ser Asp Ser Pro Asn Arg Asp Met Leu Pro Cys
65         70         75         80
Tyr Ser Val Ala Arg Ile Pro Leu Pro Asn Leu Asn Glu Asp Leu Thr
85         90         95
Cys Gly Asn Ile Leu Met Trp Glu Ala Val Thr Leu Lys Thr Glu Val
100        105        110
Ile Gly Val Thr Ser Leu Met Asn Val His Ser Asn Gly Gln Ala Thr
115        120        125
His Asp Asn Gly Ala Gly Lys Pro Val Gln Gly Thr Ser Phe His Phe
130        135        140
Phe Ser Val Gly Gly Glu Ala Leu Glu Leu Gln Gly Val Val Phe Asn
145        150        155        160

```

ES 2 658 941 T3

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

Met Leu

<210> 2

<211> 1065

5 <212> ADN

<213> virus JC

<220>

<221> CARACT-MISCELÁNEAS

10 <222> (1)..(1065)

<223> proteína de la cápside VP1

<400> 2

atggctccca ccaagcga ggcgagcsc aaggaycccg tgcaagtgcc caagctgctg 60

15 atccgtgggt gtgtcgaggt gctggaagtc aagaccggcg tggactccat taccgaggtg 120

ES 2 658 941 T3

gagtgttcc tcacccccga gatgggtgac cctgacgagc acctgagggg cttctccaag 180
 tccatctcca tctccgacac cttcgagtcc gactccccca accgtgacat gctgccctgc 240
 tactccgtgg ctcgtatccc cctgcccacac ctgaacgagg acctgacttg cggcaacatc 300
 ctgatgtggg aggctgtgac cctcaagacc gaggtcatcg gcgtgacttc cctgatgaac 360
 gtgcactcca acggccaggc taccacgac aacgggtgctg gcaagcccgt gcaggggaacc 420
 tccttccact tcttctccgt ggggtggcgag gctctggaac tccagggcgt ggtgttcaac 480
 taccgtacca agtacccccga cggcaccatc ttcccccaaga acgctactgt gcagtcccaa 540
 gtgatgaaca ccgagcaciaa ggcttacctg gacaagaaca aggcctaccc cgtggagtgc 600
 tgggtgcccg accccacccg taacgagaac acccgttact tcggcaccct gaccggtgga 660
 gagaacgtgc cccccgtgct gcacatcacc aacaccgcta ccaccgtgct gctggacgag 720
 ttcggtgtcg gtcccctgtg caagggcgac aacctgtacc tgtccgctgt ggacgtgtgc 780
 ggcattgtca ccaaccgttc cggttcccag cagtggcgtg gcctgtcccg ctacttcaag 840
 gtgcagctgc gcaagcgtcg tgtgaagaac ccctacccta tctccttctt gctgaccgac 900
 ctgatcaacc gtcgtacccc tcgtgtggac ggccagccca tgtacggcat ggacgctcag 960
 gtggaagagg tccgcgtggt cgagggcacc gaggaattgc ccggcgaccc cgacatgatg 1020
 cgttacgtgg acaagtacgg ccagctccag accaagatgc tgtaa 1065

<210> 3

5 <211> 344

<212> PRT

<213> virus JC

<220>

10 <221> CARACT-MISCELÁNEAS

<222> (1)..(344)

<223> proteína de la cápside VP2

<400> 3

15

Met Gly Ala Ala Leu Ala Leu Leu Gly Asp Leu Val Ala Thr Val Ser
 1 5 10 15

Glu Ala Ala Ala Ala Thr Gly Phe Ser Val Ala Glu Ile Ala Ala Gly
 20 25 30

Glu Ala Ala Ala Thr Ile Glu Val Glu Ile Ala Ser Leu Ala Thr Val
 35 40 45

Glu Gly Ile Thr Ser Thr Ser Glu Ala Ile Ala Ala Ile Gly Leu Thr
 50 55 60

Pro Glu Thr Tyr Ala Val Ile Thr Gly Ala Pro Gly Ala Val Ala Gly
 65 70 75 80

Phe Ala Ala Leu Val Gln Thr Val Thr Gly Gly Ser Ala Ile Ala Gln
 85 90 95

ES 2 658 941 T3

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

5 <210> 4
 <211> 1032
 <212> ADN
 <213> virus JC

10 <220>
 <221> CARACT-MISCELÁNEAS
 <222> (1)..(1032)
 <223> proteína de la cápside VP2

<400> 4

ES 2 658 941 T3

```

atgggtgccg cacttgcaact tttgggggac ctagtgtgcta ctgtttctga ggctgctgct    60
gccacaggat tttcagtagc tgaattgct gctggagagg ctgctgctac tatagaagtt    120
gaaattgcat cccttgctac tgtagagggg attacaagta cctctgaggc tatagctgca    180
ataggcctta ctctgaaac atatgctgta attactggag ctccgggggc tgtagctggg    240
tttgcctgcat tggttcaaac tgtaactggt ggtagtgtgcta ttgctcagtt gggatataga    300
ttttttgctg actgggatca taaagtttca acagttgggc tttttcagca gccagctatg    360
gctttacagt tatttaatcc agaagactac tatgatattt tatttcctgg agtgaatgcc    420
tttgtaaca atattcacta tttagatcct agacattggg gcccttcttt gttctccaca    480
atctcccagg ctttttgaa tcttgttaga gatgatttgc catctttaac atctcaggaa    540
attcaaagaa gaacccaaaa actatttgggt gaaactttag caagggtttt ggaagaaact    600
acttgggcaa tagttaattc accagttaac ttatataatt atatttcaga ctattattct    660
agattgtctc cagttaggcc ctctatggta aggcaggttg cccaaagga gggaacctat    720
atctcctttg gccactcata cacccaaagt atagataatg cagacagcat tcaagaagtt    780
acccaaaggc tagatttaaa aaacccaaat gtgcaatctg gtgaatttat agagaaaagt    840
tttgaccag gaggtgcaaa tcaaagatct gctcctcaat ggatggtgcc tttactttta    900
gggttgtagc ggactgtaac acctgctctt gaagcatatg aagatggccc caacaaaaag    960
aaaaggagaa aggaaggacc ccgtgcaagt tccaaaactt cttataagag gaggagtaga   1020
agtcttagaa gt                                                         1032

```

5 <210> 5
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> señal de localización nuclear

<400> 5

15 Cys Pro Gly Ala Ala Pro Lys Lys
 1 5

Reivindicaciones

- 5 1. Las VLP derivadas de un virus del polio humano que comprende un fármaco para usar en un método de tratamiento para terapia o un método de diagnóstico *in vivo* de una enfermedad del CNS.
2. Las VLP para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la VLP se deriva de JCV.
- 10 3. Las VLP para usar de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde la VLP atraviesa la barrera hematoencefálica para entrar en el CNS junto con el fármaco encapsulado por la VLP.
4. Las VLP para usar de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones anteriores, en donde la VLP que comprende el fármaco atraviesa la barrera hematoencefálica fisiológicamente intacta.
- 15 5. Las VLP para usar de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones anteriores, en donde la enfermedad del CNS es un trastorno neurológico, neuronal o neurodegenerativo.
6. Las VLP para usar de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones anteriores, en donde la VLP está compuesta de proteínas VP1 del virus JC.
- 20 7. Las VLP para usar de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones anteriores, en donde la VLP se administra por una ruta que permite un efecto sistémico del fármaco.
8. Las VLP para usar de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones anteriores, en donde la VLP se administra por vía intravenosa.
- 25 9. Las VLP para usar de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones anteriores, en donde la VLP comprende VP1 y/o VP2, en donde la VP1 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a la secuencia de aminoácidos según la sec. con núm. de ident.: 1 en toda su longitud y/o en donde la VP2 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 3 en toda su longitud.
- 30 10. Las VLP para usar de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones anteriores, en donde el fármaco se selecciona del grupo que consiste en un agente citotóxico, un agente detectable tal como un radionúclido, una proteína, un péptido y un ácido nucleico, seleccionado en particular del grupo que consiste en ácidos nucleicos que codifican una proteína deseada tal como ARNm, ADNc, un plásmido o vector; ácidos nucleicos inhibidores tales como siRNA o miRNA; y ácidos nucleicos que tienen actividad catalítica tal como una ribozima.
- 35 11. Las VLP para usar de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones anteriores, en donde la VLP se carga con el fármaco.
- 40 12. La composición farmacéutica para usar en un método de tratamiento por terapia o un método de diagnóstico *in vivo* de una enfermedad del CNS, en donde la composición farmacéutica comprende una VLP de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde al menos 1 %, preferentemente al menos 15 %, con mayor preferencia al menos 50 %, en particular preferido al menos 95 % de la cantidad total del fármaco se encapsula completamente en el casco de la VLP.
- 45 13. La composición farmacéutica para usar de acuerdo con la reivindicación 12, en donde las VLP no son agregadas.
- 50 14. La composición farmacéutica para usar de acuerdo con la reivindicación 12 o 13, en donde la composición se administra por vía intravenosa.
- 55 15. La composición farmacéutica para usar de acuerdo con al menos una de las reivindicaciones 12 a 14, en donde y/o la VLP atraviesa la barrera hematoencefálica para entrar en el CNS junto con el fármaco encapsulado por la VLP.

Figura 1 A

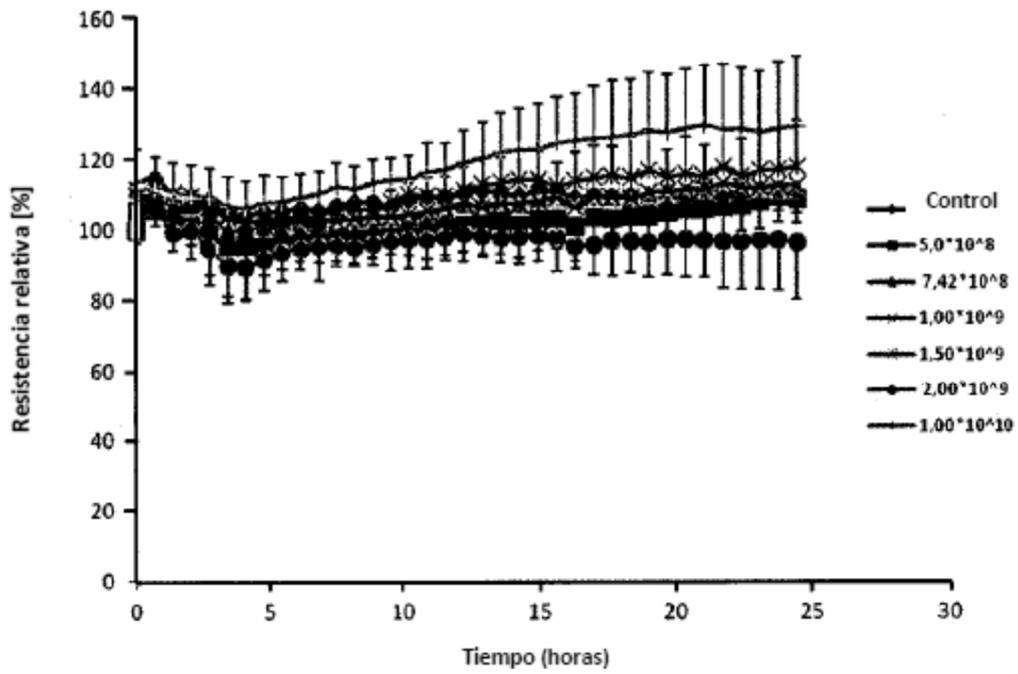


Figura 1 B

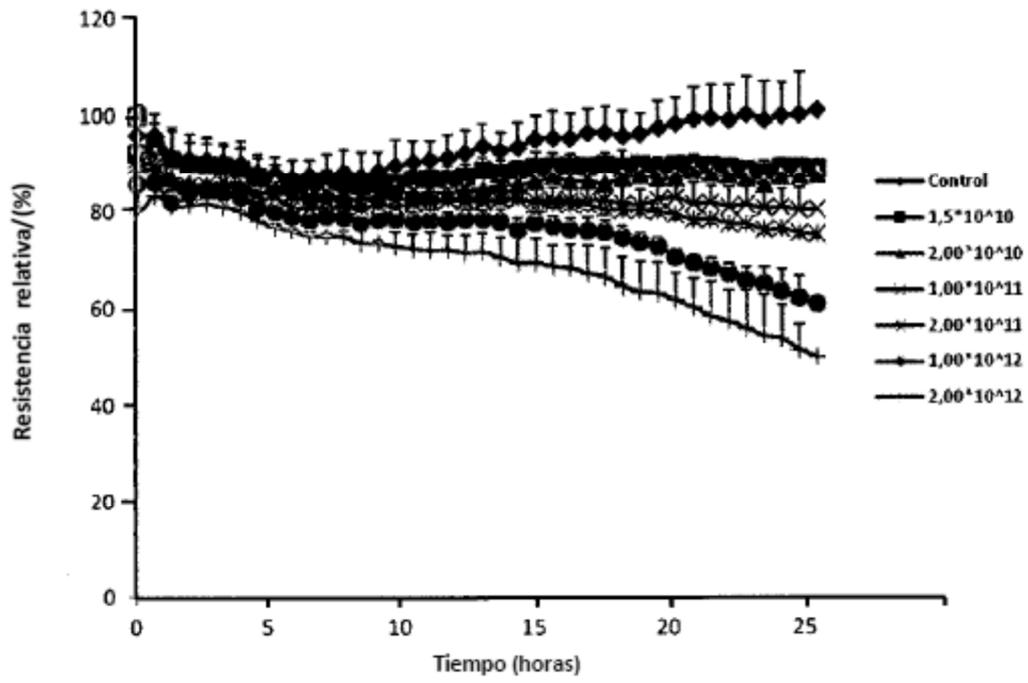


Figura 2

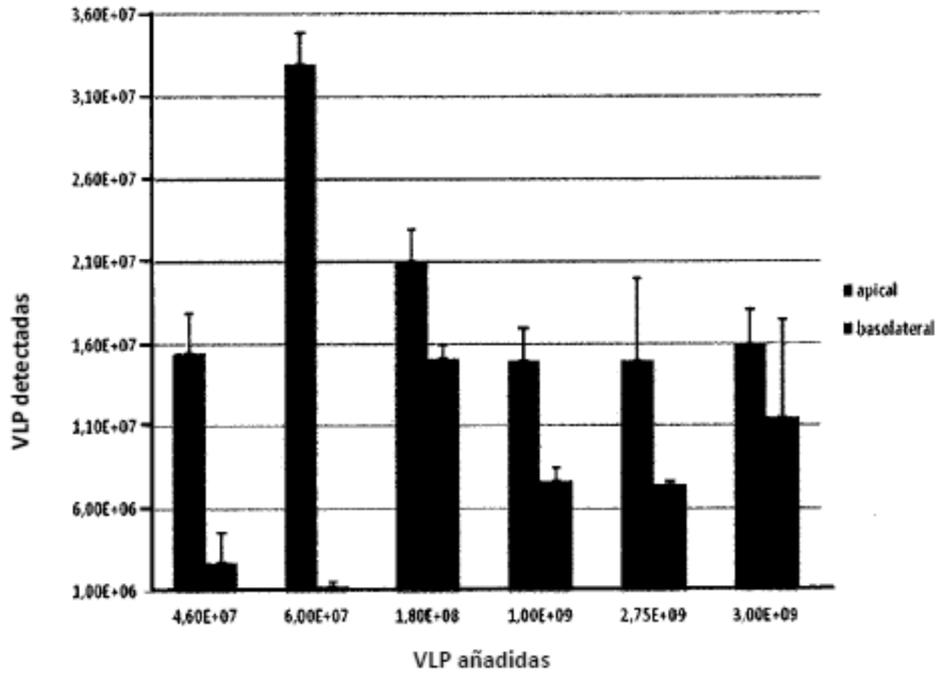


Figura 3

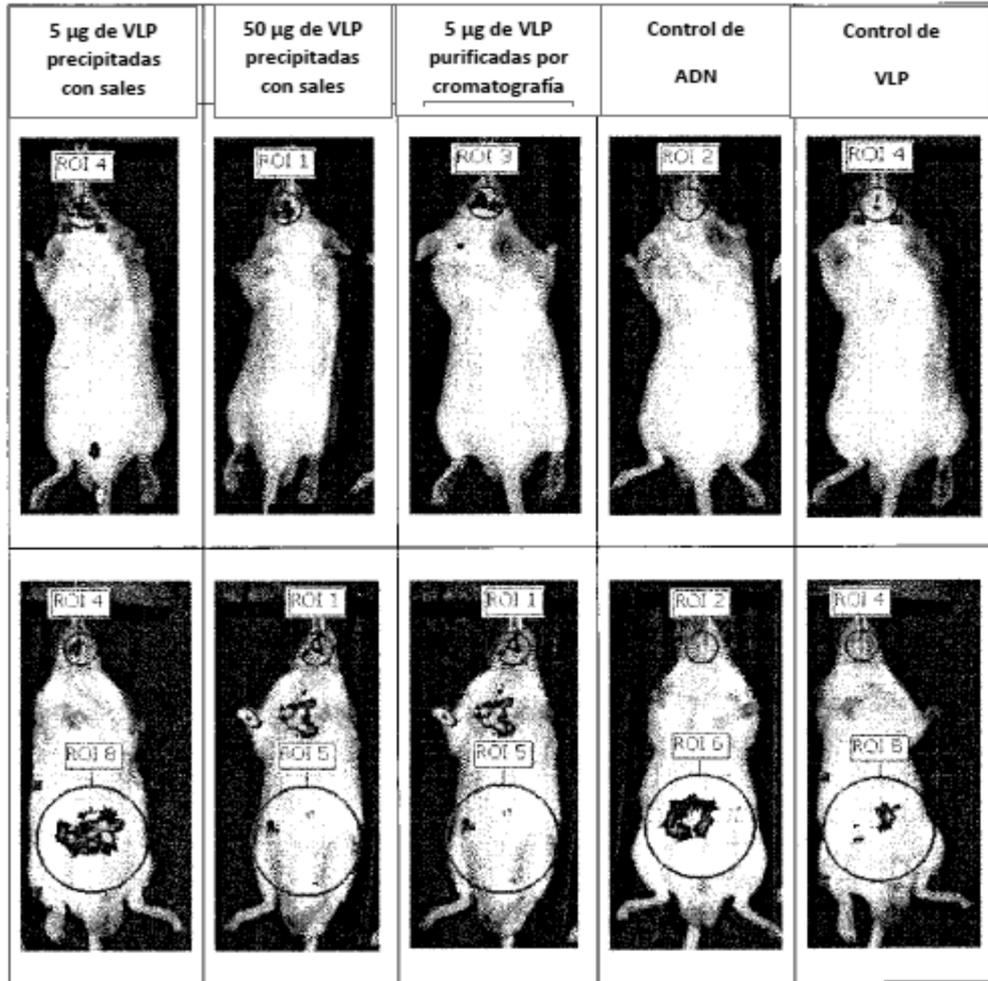


Figura 4

Señal de BLI en la cabeza después de la aplicación intravenosa de las VLP en comparación con el grupo Control de VLP

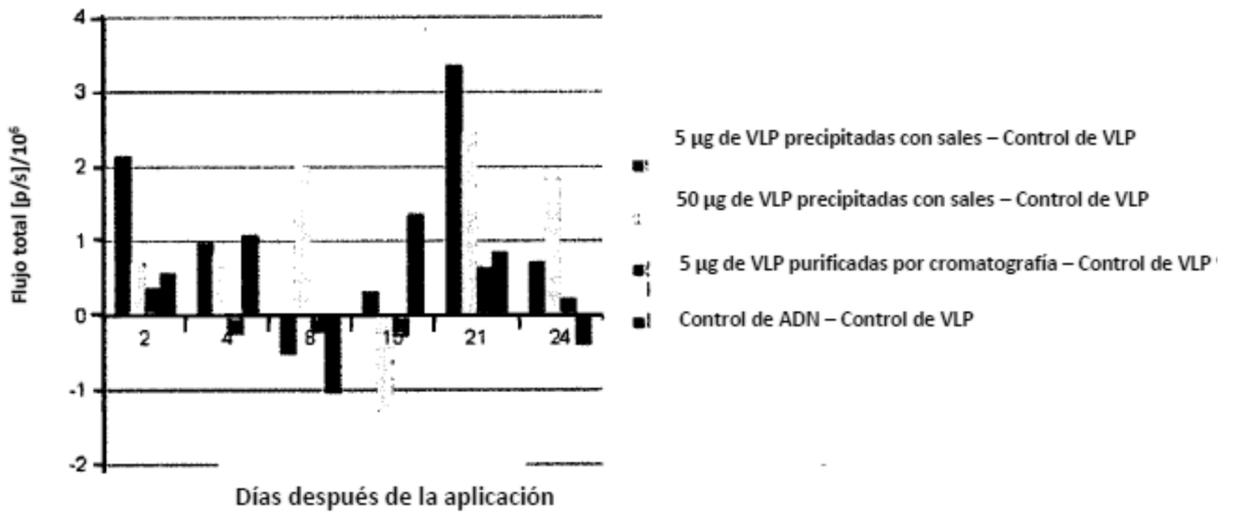


Figura 5 A

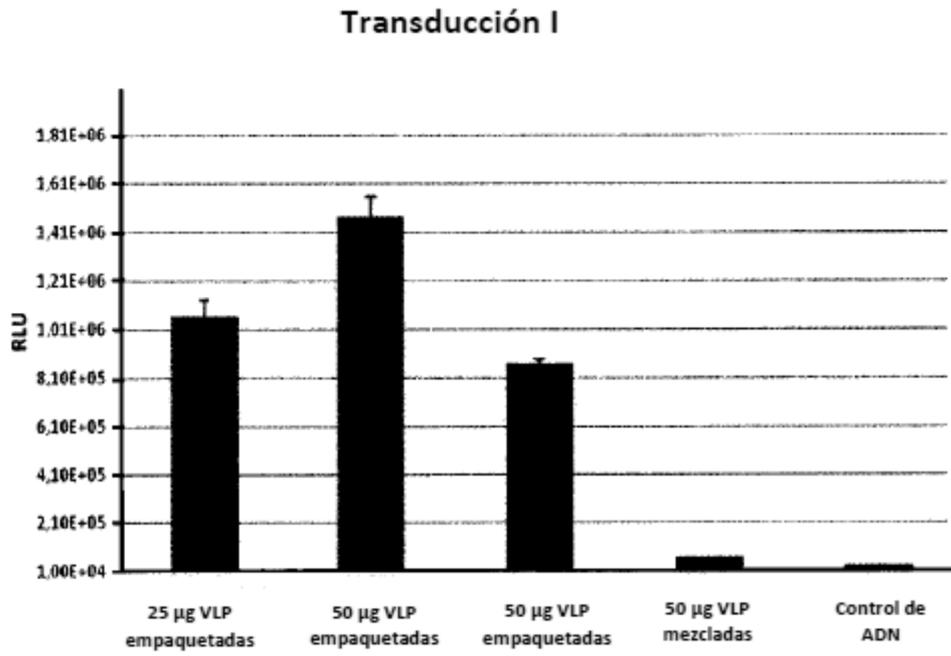


Figura 5 B

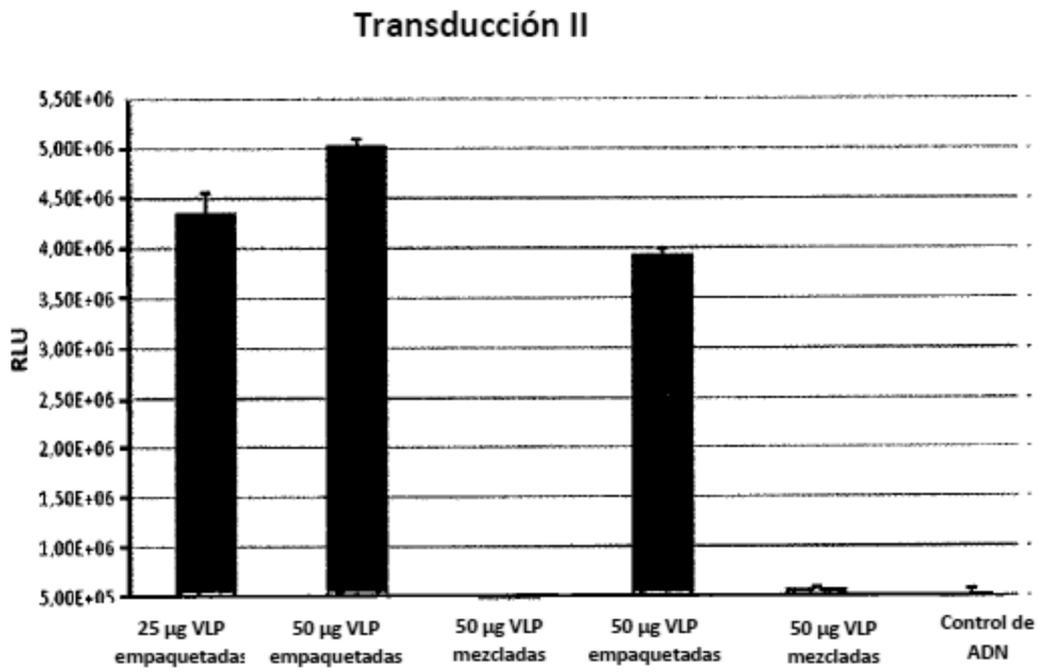


Figura 6

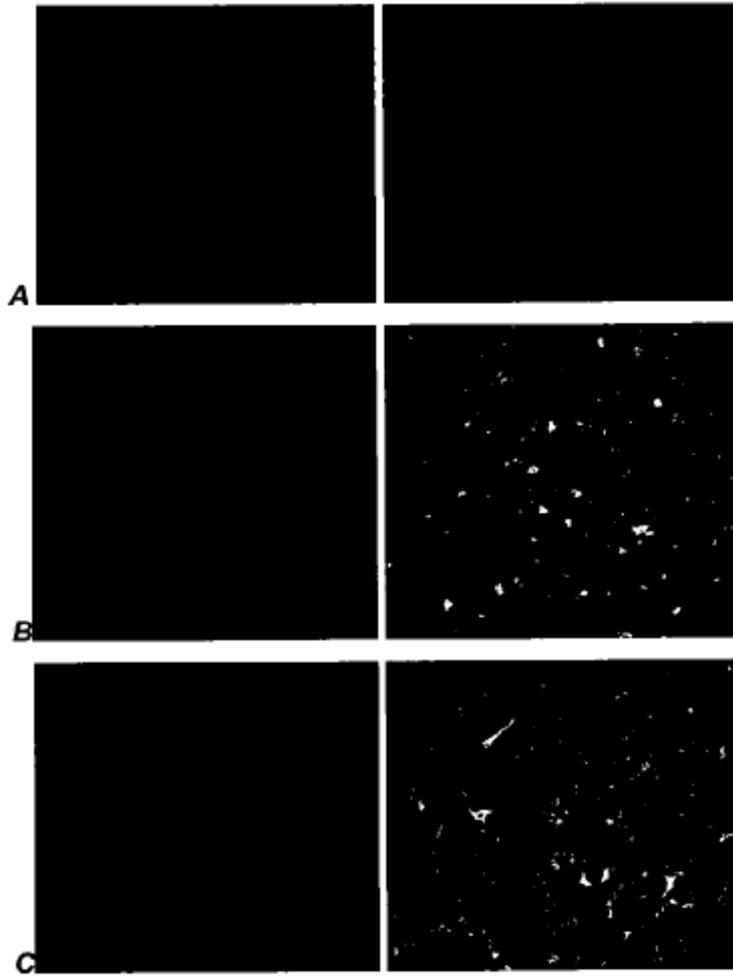


Figura 7

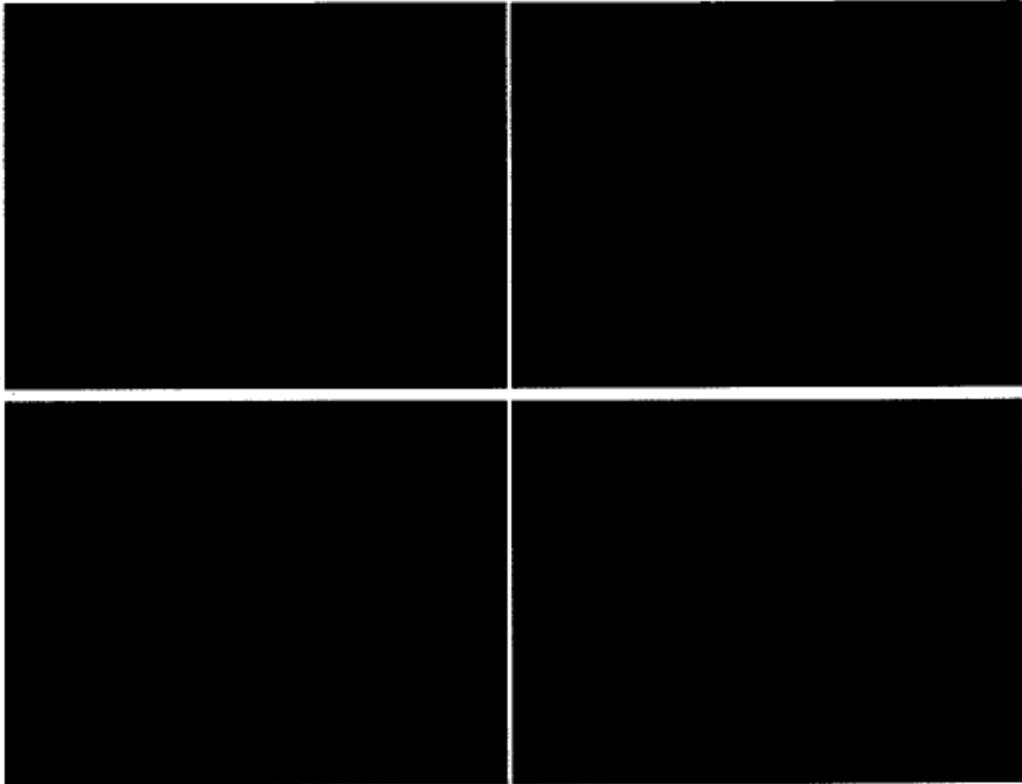


Figura 8

