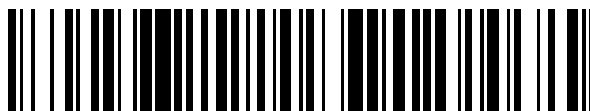


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 719 691**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.11.2014 PCT/EP2014/075346**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.05.2015 WO15075213**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.11.2014 E 14827177 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.01.2019 EP 3071224**

54 Título: **Procedimiento de restauración de tolerancia inmunitaria in vivo**

30 Prioridad:

22.11.2013 EP 13194126
29.01.2014 EP 14153144

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.07.2019

73 Titular/es:

AMARNA HOLDING B.V. (100.0%)
J.H. Oortweg 21
2333 CH Leiden, NL

72 Inventor/es:

HAAN, DE, PETRUS THEODORUS

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 719 691 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

Procedimiento de restauración de tolerancia inmunitaria *in vivo*

Campo de la invención

5 La presente invención proporciona un procedimiento mejorado para la restauración de la tolerancia inmunitaria *in vivo*. En particular, la descripción se refiere al uso de un gen recombinante que codifica uno o múltiples autoantígenos o partes antigénicas de los mismos para restaurar la tolerancia inmunitaria para dichos antígenos *in vivo*. La descripción también proporciona composiciones que comprenden un gen recombinante que codifica uno o múltiples autoantígenos o partes antigénicas de los mismos y los usos de los mismos como tratamiento para enfermedades autoinmunitarias.

Antecedentes de la invención

10 El sistema inmunitario consiste en una intrincada red de tejidos, células y moléculas responsables de la respuesta a la muerte celular, heridas o infección patógena y el mantenimiento de la homeostasis del cuerpo. Durante la homeostasis, las células muertas que sufren la muerte celular programada (apoptosis) son retiradas por células específicas del sistema inmunitario, por ejemplo, macrófagos y células dendríticas inmaduros, y se reponen con
 15 células que descienden de las células madre residentes en el tejido. Los componentes celulares se procesan por los macrófagos y células dendríticas inmaduros en autoantígenos que se presentan en moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) a las células del sistema inmunitario adaptativo (señal 1). Los macrófagos y células dendríticas representan por lo tanto las principales células presentadoras de antígenos en el cuerpo. La presentación de antígenos tiene lugar en presencia de moléculas co-estimulantes tolerogénicas (señal 2) tal como
 20 B7-1 (CD80), B7-H1 (CD274), B7-DC, B7-H3 y B7-H4 y quimiocinas, así como citocinas tolerogénicas tales como la interleucina 10 (IL-10) y el factor beta de transformación del crecimiento. Las células presentadoras de antígeno inmaduras tienen receptores de quimiocina CCR1, CCR2, CCR5, CCR6 y CXCR1; receptores de antígeno de la familia de lectina tipo C tal como DEC-205, el inmunorreceptor de célula dendrítica, dectina-2 y receptor 1 de lectina tipo C; el receptor manosa de macrófagos y receptores de Fc para inmunoglobulinas tales como el receptor Fc
 25 gamma y el receptor Fc épsilon; receptores tipo toll; integrinas y receptores de proteínas de choque térmico. Además, las células presentadoras de antígeno inmaduras se caracterizan por tener altos niveles intracelulares de MHC, mientras que tienen bajos niveles de B7-2 (CD86), CD40, CD25 y CD83 en su superficie. Como resultado de estas interacciones células-células homeostáticas, el sistema inmunitario está en estado de tolerancia inmunitaria.

30 Después de una herida o infección patógena, las células lesionadas o infectadas sufren necrosis y liberan patrones moleculares asociados a peligro o asociados a un agente patógeno, respectivamente. Estos patrones moleculares inducen la inflamación local en el sitio de la lesión o infección. Las células necróticas son retiradas por las células presentadoras de antígeno que maduran posteriormente y presentan los (auto) antígenos procesados a las células del sistema inmunitario adaptativo en presencia de señales proinflamatorias 2 y 3. Durante su conversión de células inmaduras a maduras, las células presentadoras de antígeno se someten a varios cambios fenotípicos y funcionales.

35 La maduración de las células presentadoras de antígeno implica: (i) la redistribución de moléculas del MHC desde los compartimentos endocíticos intracelulares a la superficie de la células; (ii) la regulación negativa de la internalización de antígenos; (iii) el aumento de la expresión de superficie de moléculas co-estimulantes tales como B7-2, CD40 y B7-H2 (CD275) (señales 2); (iv) cambios morfológicos (por ejemplo, formación de dendritas; (v) reorganización del citoesqueleto; (vi) secreción de quimiocinas tales como CCL17, CCL18, CCL22 y citocinas tales
 40 como IL3, IL4, IL5, IL6, IL12, IL13, IL14, interferón alfa, interferón beta, interferón gamma y factor de necrosis tumoral alfa (señales 3) y (vii) expresión en la superficie de moléculas de adhesión y receptores de quimiocinas tales como CXCR4 y CCR7.

Las células presentadoras de antígeno maduras se caracterizan por tener bajos niveles de receptores Fc, molécula
 45 1 de adhesión intercelular y CD58 en su superficie. Las células del sistema inmunitario adaptativo consisten principalmente en linfocitos T y B activados mediante la interacción con las células presentadoras de antígeno maduras, rompen ahora temporalmente la tolerancia inmunitaria y destruyen/aclaran las células lesionadas o infectadas de una manera específica de antígeno. Después de la respuesta de reparación de heridas normal, por lo tanto, en ausencia de patrones moleculares asociados a peligro o asociados a un agente patógeno, se restaura la tolerancia inmunitaria, de nuevo de una manera específica de antígeno.

50 En los pacientes con enfermedades degenerativas, tales como enfermedades distróficas e infecciones víricas crónicas, en un cierto momento, tejidos/órganos específicos (cerebro, músculo, sangre, hígado, ojo, piel, etc.) comienzan a acumular células necróticas. Las células necróticas inducen una inflamación que no se resuelve, en la que la activación crónica de las células del sistema inmunitario adaptativo da lugar a una rotura continua y local de la tolerancia inmunitaria y a una destrucción de células del tejido inflamado de una manera específica de antígeno. Los
 55 linfocitos T citotóxicos destruyen sus células diana induciendo la necrosis celular. Las células necróticas a su vez aumentan adicionalmente la inflamación tisular. Además, la inflamación crónica da como resultado la formación de placas de amiloide y la escarificación tisular debido al depósito de colágeno. Se ha aceptado genéricamente que esta estimulación crónica específica de autoantígeno de la respuesta inmunitaria adaptativa la que da lugar

principalmente de la destrucción tisular/orgánica (Nathan C. y Ding A., Cell 140: 871-882, 2010).

Ejemplos de trastornos genéticos que dan como resultado una enfermedad degenerativa son las enfermedades neurológicas tales como la enfermedad de Huntington y las formas familiares de demencia de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson; las distrofias musculares familiares tales como la distrofia muscular de Duchenne, distrofia muscular de Becker, miopatía de Miyoshi, distrofia muscular de las cinturas, distrofia muscular congénita, distrofia muscular distal, distrofia muscular de Emery-Dreyfuss, distrofia muscular fascio-escapulohumeral, distrofia muscular miotónica y distrofia muscular oculofaríngea; distrofias oftalmológicas tales como retinitis pigmentaria, amaurosis congénita de Leber, distrofia macular de Stargardt, acromatopsia, retinosquiasis y distrofia macular viteliforme.

En casos esporádicos, estas enfermedades son enfermedades adquiridas. Esto significa que, en individuos genéticamente predispuestos en un cierto momento, estímulos ambientales desconocidos, imitan los patrones moleculares asociados con peligro o un agente patógeno, iniciando el proceso de inflamación no resuelta de tejidos específicos. En estos casos las enfermedades se denominan enfermedades autoinflamatorias o autoinmunitarias.

Con el aumento de conocimientos en inmunología humana, la lista de enfermedades autoinmunitarias se expande rápidamente y actualmente incluye, pero no se limita a, enfermedades neurológicas tales como la demencia de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, trastorno bipolar, depresión, epilepsia, narcolepsia, enfermedad de Lyme, atrofia sistémica múltiple, esclerosis múltiple, miastenia gravis, neuromielitis óptica, enfermedad de Parkinson y esquizofrenia; enfermedades metabólicas tales como diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, tiroiditis de Hashimoto y obesidad; enfermedades musculares tales como polimiositis, dermatomiositis y miositis con cuerpos de inclusión; enfermedades oftalmológicas tales como retinopatía autoinmunitaria, degeneración macular relacionada con la edad, glaucoma y uveítis; enfermedades gastrointestinales tales como enfermedad celíaca y enfermedades intestinales inflamatorias incluyendo la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerativa; enfermedades dermatológicas tales como psoriasis, escleroderma, síndrome de Sjögren y vitiligo; enfermedades cardiovasculares tales como aterosclerosis, cardiomiopatía y miocarditis Coxsackie; enfermedades ortopédicas tales como artritis reumatoide, fiebre reumática y lupus eritematoso; y enfermedades pulmonares tales como enfermedad pulmonar obstructiva crónica y asma. Además, la amiloidosis, hepatitis autoinmunitaria, enfermedad de Chagas, endometriosis, síndrome de Goodpasture, encefalitis de Hashimoto, púrpura trombocitopénica idiopática, síndrome de Kawasaki, enfermedad de Meniere, neutropenia, síndrome de piernas sin descanso y púrpura trombocitopénica son enfermedades autoinmunitarias.

Los tratamientos actuales para los pacientes con una enfermedad degenerativa o distrófica suprimen de manera no específica la inflamación y la inmunidad, y por lo tanto solo alivian los síntomas y retrasan la progresión hacia estadios incapacitantes. Además, el uso a largo plazo de la medicación inmunosupresora coincide con efectos secundarios adversos graves y aumenta el riesgo de desarrollar procesos autoinmunitarios en otros tejidos.

Hay, por lo tanto, una urgente necesidad de tratamientos alternativos que inhiban específicamente la destrucción tisular por las células activadas del sistema inmunitario adaptativo, dejando la respuesta inmunitaria general sin afectar. En principio, esto debería ser factible cuando las enfermedades autoinmunitarias son enfermedades adquiridas. La restauración de la tolerancia inmunitaria a los autoantígenos principales implicados en la destrucción tisular autoinmunitaria ha sido un objetivo mantenido mucho tiempo en investigación de la autoinmunidad. Esto se ha intentado por la administración de los autoantígenos o fragmentos peptídicos derivados de los mismos a los pacientes. Sin embargo, debido al hecho de que estas proteínas o péptidos no se suministran eficazmente a las células presentadoras de antígeno apropiadas, que carecen las señales de acompañamiento apropiadas para revertir la respuesta inmunitaria y/o que se degraden rápidamente en el cuerpo, dichas estrategias se habían adoptado con un éxito limitado.

Una manera eficaz para instruir las células del sistema inmunitario para suprimir una respuesta autoinmunitaria es dejarlas que produzcan los autoantígenos implicados en la enfermedad autoinmunitaria introduciendo los genes que codifican el antígeno en estas células. Los ratones transgénicos que expresan proteína mielínica básica (MBP) en el hígado están protegidos de la encefalitis autoinmunitaria experimental (EAE) inducida por MBP, una enfermedad neurológica del ratón con síntomas que se parecen a la esclerosis múltiple en los seres humanos. Los ratones transgénicos que expresan MBP en la piel y el timo, sin embargo, no están protegidos de desarrollar EAE, indicando que el hígado es un importante órgano tolerogénico (Lueth S. y col., The Journal of Clinical Investigation 118: 3403-3410, 2008). En un escenario terapéutico, los genes terapéuticos que codifican autoantígenos se pueden administrar como moléculas desnudas o como ácidos nucleicos empaquetados en compuestos lipídicos y/o proteináceos. En los ratones con el modelo de EAE inducido por glicoproteína mielínica de oligodendrocito (MOG), la inyección de un plásmido de expresión que codifica MOG o MBP reducía los signos clínicos e histopatológicos de EAE tanto en escenarios profilácticos como terapéuticos (Garren H., Expert Opinion Biological Therapy 8: 1539-1550, 2008; Fissolo N. y col., Journal of Neuroinflammation 9: 139-152, 2012; documento US20100160415). En ratones con diabetes del no obeso (NOD), el modelo más utilizado comúnmente para la diabetes tipo 1 en humanos, la inyección de plásmidos de expresión que codifican preproinsulina o ácido glutámico descarboxilasa 65 (GAD65), los principales autoantígenos implicados en la destrucción autoinmunitaria de las células pancreáticas productoras de insulina, da como resultado tanto la prevención como la supresión de la diabetes autoinmunitaria (Johnson M.C. y col., Human Vaccines 7: 27-36, 2011; Guan Y. y col., Diabetes Research Clinical Practice 95: 93-97, 2012). Esta estrategia de vacunación con ADN, sin embargo, solo funciona en ratones. En el resto de las especies de mamífero

incluyendo los seres humanos, las células no captan y expresan ácidos nucleicos extracelulares.

Como los virus evolucionaron para suministrar y expresar su información genética en célula huésped diana, los vectores víricos son actualmente los vehículos de suministro genético más eficaces. Además, los vectores víricos para aplicaciones terapéuticas han demostrado ser altamente eficaces en la modulación de las respuestas inmunitarias en modelos animales de enfermedades autoinmunitarias.

El documento WO 03/045316 A2 desvela un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un autoantígeno bajo el control transcripcional del promotor SV40 temprano o tardío para el tratamiento o prevención de una enfermedad autoinmunitaria.

El documento EP 2243836 A1 describe el uso de partículas de SV40 que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica un autoantígeno para su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria.

En los ratones con artritis reumatoide inducida por la administración subcutánea de colágeno de tipo II, la progresión de la enfermedad se detuvo mediante la administración intravenosa de un vector lentivírico que codificaba colágeno tipo II (Eneljung T. y col., *Clinical and Developmental Immunology* 2013: 11, 2013).

En ratones NOD a los que se había administrado vectores de virus adeno-asociado (AAV) o lentivírico que codifican preproinsulina o GAD65, se restauró la tolerancia inmunitaria a las células pancreáticas productoras de insulina y se previno el desarrollo de diabetes tipo 1 (Johnson M.C. y col., *Human Vaccines* 7: 1-10, 2011; Jindal R.M. y col., *International Journal of Experimental Diabetes Research* 2: 129-138, 2001; Dresch C. y col., *Journal of Immunology* 181: 4495-4506, 2008; Han G. y col., *Journal of Immunology* 174: 4516-4524, 2005; Han G. y col., *Immunology Letters* 115: 110-116, 2008; Xu B. y Scott D.W., *Clinical Immunology* 111: 47-52, 2004). El implante de células madre derivadas de médula ósea o células hepáticas transducidas *ex vivo* con vectores lentivíricos que codifican epítomos MOG principales en ratones, protegía los animales tratados de la EAE inducida por MOG (Hoffman B.E. y Herzog R.W., *The Journal of Clinical Investigation* 118: 3271-3273, 2008; De Andrade Pereira D. y col., *Gene Therapy* 20: 556-566, 2013). El suministro intratímico de MOG utilizando un vector lentivírico inducía una tolerancia inmunitaria central al MOG lo que prevenía el desarrollo de EAE en ratones al desafiarlos con MOG (Marodon G. y col., *Blood* 108: 2972-2978, 2006). La progresión de EAE en ratones que recibieron MOG primero, sin embargo, no se pudo parar utilizando esta estrategia de tolerización central (Siatskas C. y col., *Molecular Therapy* 20: 1349-1359, 2012). Este estudio demuestra que los autoantígenos necesitan expresarse y exponerse en las células presentadoras de antígeno de la periferia preferentemente en órganos tolerogénicos, con el fin de invertir la respuesta inmunitaria pre-existente en una respuesta de tolerancia inmunitaria.

Estos y otros estudios con animales han demostrado que se puede inducir una respuesta de tolerancia inmunitaria contra una auto-proteína cuando el gen que codifica la auto-proteína se expresa de manera ectópica bajo el control transcripcional de promotores específicos del hígado derivados de genes huéspedes, tal como los promotores de la albúmina, el CD190, la anti-tripsina alfa (AAT), la proteína C reactiva (CRP) o la proteína transmembrana específica de las células dendríticas (DC-STAMP) (Follenzi A. y col., *Blood* 103: 3700-3709, 2004; Siatskas C. y col., *Molecular Therapy* 20: 1349-1359, 2012; Lueth S. y col., *The Journal of Clinical Investigation* 118: 3403-3410, 2008; De Andrade Pereira D. y col., *Gene Therapy* 20: 556-566, 2013; Hoffman B.E. y Herzog R.W., *The Journal of Clinical Investigation* 118: 3271-3273, 2008). Además, la expresión específica del hígado de los factores de coagulación VIII o IX introducidos mediante vectores AAV o lentivíricos restauraba eficazmente la tolerancia inmunitaria de los factores de coagulación en perros y ratones con inmunidad pre-existentes a estos factores (Siatskas C. y col., *Molecular Therapy* 20: 1349-1359, 2012; Finn J.D. y col., *Blood* 116: 5842-5848, 2010). Sin embargo, recientes estudios clínicos de terapia genética demostraron que los promotores específicos de órganos y derivados del huésped que se utilizan para el control de transcripción de los genes terapéuticos no son suficientemente potentes para dar lugar a niveles terapéuticos de las auto-proteínas en los pacientes tratados (Nathwani A.C. y col., *New England Journal of Medicine* 365: 2357-2365, 2011).

Además, la expresión ectópica de genes que codifican auto-proteínas bajo el control transcripcional de fuertes promotores víricos constitutivos tal como el promotor temprano inmediato de citomegalovirus (CMV) o los promotores con terminaciones repetidas largas da lugar a la inducción de una respuesta inmunitaria adaptativa dirigida contra la auto-proteína (Follenzi A. y col., *Blood* 103: 3700-3709, 2004; Ko H.J. y col., *Autoimmunity* 44: 177-187, 2011). Por ejemplo, se ha descubierto que los macacos desarrollan anemia autoinmunitaria con la terapia genética con vectores de virus adeno-asociados que codifican eritropoyetina (Gao G. y col., *Blood* 103: 3300-3302, 2004; Chenuaud P. y col., *Blood* 103: 3303-3304, 2004). La eritropoyetina se sobre-expresaba en macacos bajo el control del promotor temprano inmediato de citomegalovirus o un promotor inducible por doxiciclina derivado de la repetición terminal larga de VIH-1. Se descubrió que estos animales desarrollan una respuesta inmunitaria adaptativa contra la eritropoyetina endógena o las células que producen eritropoyetina. Por eso la terapia inmunitaria en la que se sobre-expresan autoantígenos puede inducir una enfermedad autoinmunitaria más que una cura.

Aunque las estrategias de tolerización basadas en vectores víricos para tratar enfermedades degenerativas utilizando promotores específicos de órgano y derivados del huésped que dirigen la expresión de autoantígenos parecen prometedoras, resulta obvio en la técnica anterior descrita anteriormente que existe una necesidad no satisfecha de un tratamiento que restaure la tolerancia inmunitaria a dichos autoantígenos.

Sumario de la invención

Los objetivos se han alcanzado como se describe en el presente documento ya que se proporciona un procedimiento para restaurar la tolerancia inmunitaria *in vivo*. La descripción proporciona el uso de un gen recombinante que comprende una secuencia de ADN heteróloga que alberga el dominio codificante de uno o múltiples autoantígenos o partes antigénicas de los mismos y en el que el ADN heterólogo se expresa en una célula diana bajo el control transcripcional de un promotor poliomavérico temprano y tardío de longitud completa, al que se hace referencia también como la región poliomavérica intergénica. Esto da lugar a la restauración de la tolerancia inmunitaria a dichos autoantígenos *in vivo*. Se prefiere que la región poliomavérica intergénica sea la región intergénica de SV40 o el promotor temprano y tardío de SV40 de longitud completa como se desvela en la SEQ ID NO: 12. También se prefiere que se utilice un promotor de acuerdo con la SEQ ID NO: 1.

La presente descripción proporciona, por lo tanto, un procedimiento para la restauración de la tolerancia inmunitaria *in vivo*. La descripción se refiere al uso de un gen recombinante que codifica autoantígenos o partes antigénicas de los mismos para restaurar la tolerancia inmunitaria a dichos autoantígenos *in vivo*, bajo el control transcripcional de promotores poliomavéricos tempranos y tardíos. La descripción se refiere también al uso de vector de suministro genético de partículas poliomavéricas recombinantes, tal como una partícula vírica de vector del virus 40 de simio (SV40) que codifican uno o múltiples autoantígenos o partes antigénicas de los mismos bajo el control transcripcional de un promotor poliomavérico temprano y tardío tal como el promotor de SV40 temprano y tardío de longitud completa, para la restauración de la tolerancia inmunitaria a dichos autoantígenos *in vivo*. La descripción también se refiere a composiciones que comprenden los genes recombinantes o los vectores poliomavéricos y los usos de las mismas como tratamiento para enfermedades degenerativas o distróficas.

Se prefiere que se utilice un promotor poliomavérico temprano y tardío de longitud completa, preferentemente el promotor de SV40 temprano y tardío, (SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 1).

Leyenda de la figura

Figura 1: Gráficos que muestran la relación entre la supresión de ARN de interferencia (0, 10, 50 y 100 nanogramos de VP35) y la expresión de luciferasa bajo el control de tres promotores diferentes: Panel A: promotor temprano inmediato de CMV (pRL-CMV), Panel B: promotor temprano de SV40 (pGL3) y Panel C: el promotor de SV40 temprano y tardío de longitud completa (SVLuc, SEQ ID NO: 12).

Descripción detallada de la invención

El presente inventor ha descubierto sorprendentemente que las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas secretaban citocinas tolerogénicas al transfectarlas con un plásmido de expresión que codifica un antígeno bajo el control de un promotor poliomavérico temprano y tardío de longitud completa.

Los plásmidos de expresión se construyeron de manera que la expresión de luciferasa de luciérnaga y la glicoproteína mielínica de oligodendrocitos (MOG) estaban bajo el control transcripcional de la región poliomavérica intergénica. Se descubrió que se inducía tolerancia inmunitaria contra estos antígenos. Este resultado muestra que los inventores eran capaces de inducir tolerancia contra el autoantígeno, así como no autoantígeno expresando estos antígenos bajo el control de la región poliomavérica intergénica, que comprende el promotor poliomavérico temprano y tardío de longitud completa.

Esto es al contrario que la discriminación de que los promotores víricos inducen una respuesta inmunitaria adaptativa contra un producto transgénico expresado bajo su control transcripcional. Sin querer quedar ligados por teoría alguna, los inventores plantean la hipótesis de que la razón principal de por qué los promotores víricos en general inducen una respuesta inmunitaria *in vivo* es que estos promotores víricos inducen un ARN de interferencia, por el que las moléculas de ARN mensajero que codifican los productos transgénicos se degradan, resultando en la acumulación de moléculas de ARN corto de doble cadena en el citoplasma. Las moléculas de ARN de doble cadena son inductores altamente eficaces de respuestas inflamatorias.

La capacidad de los promotores para inducir un ARN de interferencia en las células se puede ensayar en un ensayo en el que el plásmido de expresión que codifica una proteína indicadora bajo el control transcripcional de un promotor que se va a ensayar se transfiere a las células en presencia o ausencia de un plásmido de expresión que codifique un supresor vírico de ARN de interferencia, tal como la proteína VP35 del virus Ébola. En este ensayo las células que contienen los plásmidos de expresión con promotores que inducen ARN de interferencia acumulan bajas cantidades de la proteína indicadora en ausencia del supresor vírico del ARN de interferencia. Las células que contienen los plásmidos de expresión con promotores que no inducen ARN de interferencia acumulan grandes cantidades de la proteína indicadora independientemente de la presencia o ausencia del supresor vírico del ARN de interferencia (Figura 1).

De manera similar al promotor temprano inmediato de citomegalovirus y los promotores retrovíricos de repeticiones terminales largas, el promotor temprano de SV40 presente en los plásmidos de expresión descritos en el documento US20100160415 y en los plásmidos de expresión disponibles en el mercado tales como pGL3, pSG5, pRC/RSV son potentes inductores de ARN de interferencia en las células y por lo tanto de respuestas inmunitarias adaptativas *in*

vivo. Dichos promotores tempranos de SV40 disponibles en el mercado comprenden solo una parte de la región intergénica de SV40 que incluye los dominios con los sitios de unión para los factores de transcripción, el origen de replicación y las secuencias amplificadoras transcripcionales. Varios informes hacen mención del uso potencial de promotores SV40 no especificados (documentos WO 03045316 A2; WO 2006124375 A2; US 2002068715 A1; US 2012076808 A1) para la restauración de la tolerancia inmunitaria *in vivo*. Los promotores de SV40 no especificados comprenden parte de la región intergénica del SV40 y no son equivalentes al promotor de SV40 temprano y tardío de longitud completa de la presente descripción (SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 1).

En un aspecto preferido, el procedimiento que se describe en el presente documento incluye el uso de la región intergénica de SV40 entre los nucleótidos 5171 y 334 del genoma del SV40 publicado bajo la secuencia de referencia NC_001669 en el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) (SEQ ID NO: 12). Esta región contiene el promotor temprano y tardío con los sitios de unión para los factores de transcripción, el origen de replicación, todas las secuencias amplificadoras transcripcionales, el origen de replicación y las señales de encapsidación y una estructura secundaria de ADN que es responsable de la unión específica y eficaz de la ARN polimerasa dependiente del ADN del huésped (Vogel F. y col., Gene 16: 331-334, 1981). La incapacidad para la inducción de ARN de interferencia en una célula de mamífero hace que un promotor poliomavérico temprano y tardío de longitud completa sea idealmente adecuado para la inducción de tolerancia inmunitaria *in vivo* (véase el ejemplo 15).

Como el promotor de SV40 temprano y tardío de longitud completa también comprende el origen de replicación y señales de encapsidación vírica, el plásmido de expresión se utilizó para la producción de un vector de suministro genético de partículas de SV40 con defectos en replicación deficiente en replicación (indicado como SVLuc). Las PBMC humanas transducidas con las partículas SVLuc también secretan citocinas tolerogénicas. Además, los macrófagos y células dendríticas presentes en las células mononucleares transducidas que tienen moléculas co-estimulantes tolerogénicas y receptores de quimiocinas en su superficie presentaban altos niveles intracelulares de MHC, indicando que estas células permanecen inmaduras. Por el contrario, las PBMC humanas transducidas con un vector SV40 recombinante que codifica la luciferasa de luciérnaga bajo el control transcripcional del promotor temprano inmediato de citomegalovirus, secretaba citocinas pro-inflamatorias. Los macrófagos y células dendríticas presentes en las células que tienen moléculas co-estimulantes proinflamatorias y receptores de quimiocinas en su superficie y presentan bajos niveles intracelulares de MHC, indicando que estas células maduraron. Se concluyó a partir de este sorprendente resultado que, aunque la región intergénica entera de SV40 de longitud completa es de origen vírico, es capaz de inducir tolerancia inmunitaria. Como los vectores poliomavéricos de suministro genético, incluyendo los vectores de SV40, son inmunológicamente inertes en seres humanos, dichos vectores tienen la capacidad única de inducción de una respuesta de tolerancia inmunitaria activa para una auto-proteína codificada por el vector. Los vectores poliomavéricos con defectos de replicación o deficientes en replicación, en los que se ha remplazado el dominio codificante temprano o tardío con un gen que codifica un autoantígeno y donde el autoantígeno se expresa en las células transducidas bajo el control transcripcional de la región intergénica entera poliomavérica de longitud completa, son altamente eficaces en la restauración de la tolerancia inmunitaria específica de autoantígeno en pacientes con una enfermedad degenerativa, tal como una enfermedad autoinmunitaria.

El SV40 pertenece a los Poliomavirus, que comprende una familia de virus ADN (de doble cadena) sin envoltura con cápsides icosaédricas. El SV40 tiene un genoma circular con una longitud de 5,25 kilopares de bases y consiste en dos regiones reguladoras: la región promotora/de origen y la región de poliadenilación, así como las regiones temprana y tardía. El promotor de SV40 temprano controla la transcripción de la región temprana, que codifica los antígenos T pequeño y grande. El promotor tardío controla la transcripción de la región tardía, que codifica las proteínas de la cápside vírica (VP1, VP2 y VP3).

En los vectores poliomavéricos, las secuencias específicas del antígeno T se han eliminado, no solo para hacer los vectores incompetentes a la replicación, sino también para eliminar completamente su inmunogenicidad. Se han producido y ensayado vectores poliomavéricos derivados de SV40, en los cuales los genes terapéuticos o ácidos nucleicos se expresan en las células diana bajo el control transcripcional del promotor vírico temprano. Dichos vectores se han utilizado para la transferencia genética en una amplia variedad de tejidos y tipos celulares humanos, por ejemplo, médula ósea (Rund D. y col., Human Gene Therapy 9: 649-657, 1998), el hígado (Strayer D.S. y Zern M.A., Seminars in Liver Disease 19: 71-81, 1999) y células dendríticas (Vera M. y col., Molecular Therapy 12: 950-959, 2005).

Los vectores poliomavéricos, tal como el SV40, se conocen porque infectan células que no se dividen, así como en división. Como el SV40 es un poliomavirus de macaco que no existe en la población humana y los vectores SV40 son deficientes en replicación, los vectores SV40 son no inmunogénicos en seres humanos y permiten la administración repetida al mismo individuo (Strayer D.S. y Zern M.A., Seminars in Liver Disease 19: 71-81, 1999).

La presente descripción se refiere al uso de un gen recombinante que comprende un ADN heterólogo que codifica uno o múltiples autoantígenos o partes antigénicas de los mismos y una región intergénica entera poliomavérica de longitud completa, para la restauración de la tolerancia inmunitaria a dichos autoantígenos *in vivo*.

Como se describen en el presente documento, el ADN heterólogo se refiere a una secuencia de ADN que codifica uno o múltiples autoantígenos o partes antigénicas de los mismos. El término autoantígeno como se utiliza en el

presente documento se usa para una proteína producida por células de un paciente que padece una enfermedad degenerativa o distrófica, que está direccionada específicamente por el sistema inmunitario de los pacientes y que como resultado está implicada en la destrucción de dichas células en el curso de la enfermedad. Un ejemplo adecuado de una enfermedad degenerativa o distrófica es una enfermedad autoinmunitaria.

- 5 El sistema inmunitario adaptativo comprende componentes humorales y celulares. El sistema inmunitario adaptativo humoral consiste en anticuerpos producidos por los linfocitos B. El sistema inmunitario adaptativo celular consiste principalmente en linfocitos T. Tradicionalmente, la calificación de una enfermedad como autoinmunitaria se basaba en la detección de anticuerpos llamados autoanticuerpos que reconocen y se unen a los autoantígenos.

10 Los procedimientos para identificar autoantígenos que están implicados en la destrucción tisular autoinmunitaria se basan en la detección de componentes del sistema inmunitario adaptativo celular incluyendo pero sin limitarse a: i) construcción de una biblioteca de ADNc de expresión del tejido afectado por una enfermedad degenerativa o distrófica; ii) expresión de los ADNc en las células humanas; iii) poner dichas células humanas en contacto con PBMC obtenidas de pacientes con dicha enfermedad degenerativa o distrófica; iv) medición de las cantidades de citocinas proinflamatorias producidas por los linfocitos activados presentes en la población de PBMC. Las moléculas de ADNc que inducen la producción de citocinas proinflamatorias en las PBMC de los pacientes con una enfermedad degenerativa o distrófica codifican un autoantígeno principal implicado en la destrucción tisular autoinmunitaria.

15 Un procedimiento alternativo para identificar autoantígenos que están implicados en la destrucción tisular autoinmunitaria también se basa en la detección de componentes del sistema inmunitario adaptativo celular. Dicho procedimiento alternativo incluye: i) la construcción de una biblioteca de ADNc de expresión del tejido afectado por una enfermedad degenerativa; ii) la expresión del ADNc en las PBMC obtenidas de pacientes con dicha enfermedad degenerativa; iii) medición de las cantidades de citocinas proinflamatorias producidas por los linfocitos T activados presentes en la población de PBMC. Las moléculas de ADNc que inducen la producción de citocinas proinflamatorias en las PBMC de pacientes con una enfermedad degenerativa codifican un autoantígeno principal implicado en la destrucción tisular autoinmunitaria.

20 Con el fin de confirmar que el autoantígeno identificado es un director principal de la destrucción autoinmunitaria, la proteína codificada por el ADNc se produce en las células utilizando técnicas convencionales bien conocidas en la técnica. La proteína purificada se inyecta posteriormente en un mamífero junto con un fuerte adyuvante tal como el adyuvante completo de Freund. El mamífero al que se inyecta se controlará posteriormente en cuanto al desarrollo de síntomas de la enfermedad degenerativa o distrófica. Se administra a los mamíferos que desarrollan síntomas de enfermedad degenerativa o distrófica un autoantígeno implicado en la destrucción celular autoinmunitaria.

25 En varias enfermedades autoinmunitarias se conocen los autoantígenos principales implicados en la destrucción celular autoinmunitaria. Para la mayoría de las enfermedades degenerativas o distróficas, sin embargo, dichos autoantígenos esperan a ser identificados utilizando los procedimientos de confirmación descritos anteriormente o utilizando otros procedimientos inmunológicos conocidos por los expertos en la técnica. Ejemplos de autoantígenos implicados en una enfermedad autoinmunitaria son: la cadena ligera de neurofilamento (NFL) y la actinina alfa implicadas en la esclerosis lateral amiotrófica; forminotransferasa ciclodesaminasa implicada en la hepatitis autoinmunitaria; transglutaminasa tisular implicada en la enfermedad celíaca; colágeno tipo IV implicada en el síndrome de Goodpasture; tiroglobulina implicada en la tiroiditis de Hashimoto; glicoproteínas específicas de plaquetas IIb/IIIa, Ib/IX, Ia/IIa y IV implicada en la púrpura trombocitopénica idiopática; factor de crecimiento endotelial implicado en la enfermedad de Lyme; el receptor de acetilcolina implicado en la miastenia gravis; hipocretina-1/orexina implicada en la narcolepsia; acuaporina 4 implicada en la neuromielitis óptica; componentes del complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) implicados en el lupus eritematoso sistémico; glicoproteína mielínica del oligodendrocito (MOG) y proteína mielínica básica (MBP) implicadas en la esclerosis múltiple; miembro 1 del complejo receptor SNAP de Golgi (GOSR1) implicado en la obesidad y la resistencia a la insulina inducida por obesidad (diabetes tipo 2); queratina implicada en la psoriasis; colágeno tipo II implicado en la artritis reumatoide; proinsulina y ácido glutámico decarboxilasa 65 implicada en la diabetes tipo 1; elastina y beta-2-glicoproteína I implicada en la aterosclerosis y enfermedad pulmonar obstructiva crónica; alfa-fodrina implicada en el síndrome de Sjögren; el receptor de glutamato tipo 3 (GluR3) implicado en la epilepsia; histidil-ARNt-sintetasa y proteína C unida a miosina en las distrofias musculares; cochlin y beta-tectorina en la enfermedad de Meniere; arrestina, colágeno tipo I y proteína de unión al interfotorreceptor retinoide en las distrofias oftalmológicas y enfermedades autoinmunitarias.

30 La secuencia de la región intergénica poliomavírica reside entre las regiones codificantes temprana y tardía y comprende el promotor poliomavírico temprano y tardío. La descripción también proporciona el uso de la región intergénica de SV40 en el ADN genómico de SV40 que reside entre las regiones codificantes temprana y tardía y comprende el promotor de SV40 temprano y tardío de longitud completa (SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13) que comprenden el promotor SV40 temprano y tardío de longitud completa).

35 Por "promotor" se quiere decir una secuencia de nucleótidos a partir de la cual se inicia la transcripción de ADN unido operativamente corriente (es decir, en la dirección 3' de la cadena en sentido del ADN de doble cadena). "Unido operativamente" significa unido como parte de la misma molécula de ácido nucleico, posicionada

adecuadamente y orientada para la transcripción que se inicia desde el promotor. El ADN unido operativamente a un promotor está "bajo el control transcripcional" del promotor.

5 Hablando en general, los expertos en la técnica son bien capaces de construir un gen recombinante que comprenda un ADN heterólogo que codifique uno o múltiples autoantígenos o partes antigénicas de los mismos y promotores poliomavíricos temprano y tardío de longitud completa. Para más detalles véase, por ejemplo, Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 2ª edición, Sambrook y col., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

10 También se describe en el presente documento que el gen recombinante se empaqueta en un vector de suministro genético de partículas poliomavíricas recombinantes, que codifican uno o múltiples autoantígenos o partes antigénicas de los mismos bajo el control transcripcional del promotor poliomavírico temprano y tardío de longitud completa, para restaurar la tolerancia inmunitaria *in vivo*.

También se describe en el presente documento que el gen recombinante se empaqueta en partículas víricas de suministro genético poliomavíricas recombinantes de primate, tal como un poliomavirus de simio, más particularmente vector de suministro genético de partículas de SV40, un virus de simio 12 (SV12), un poliomavirus linfotrópico, un poliomavirus de mono verde africano o un poliomavirus de chimpancé.

15 La tolerancia inmunitaria se puede inducir en un sujeto por expresión ectópica del gen recombinante como se describe en el presente documento, o por vector de suministro genético de partículas poliomavíricas recombinantes como se describe en el presente documento. El término expresión ectópica que se utiliza en el presente documento se refiere a la acumulación de uno o múltiples autoantígenos o partes antigénicas de los mismos en tipos celulares que en condiciones normales no acumulan dichas proteínas o partes antigénicas de las mismas. La inducción de tolerancia inmunitaria puede demostrarse experimentalmente de la siguiente manera: i) se transfectan PBMC
20 humanas con un gen recombinante como se describe en el presente documento, o se transducen con vector de suministro genético de partículas poliomavíricas recombinantes de primate como se describe en el presente documento, que codifican uno o múltiples autoantígenos o partes antigénicas de los mismos; ii) las PBMC transfectadas o transducidas secretan citocinas tolerogénicas tales como IL10 y factor de crecimiento transformante beta, mientras que las cantidades de citocinas proinflamatorias tales como IL3, IL4, IL5, IL6, IL12, IL13, IL14, interferón alfa, interferón beta, interferón gamma y factor de necrosis tumoral permanecen bajas; iii) los macrófagos y células dendríticas aislados de las PBMC se mantienen inmaduros. El estadio de maduración de los macrófagos y las células dendríticas se pueden estimar midiendo las cantidades y localización de marcadores de maduración específicos tales como B7-1, B7-2, CD40, CD25, CD58, CD83, receptores de Fc y molécula 1 de adhesión
25 intercelular.

También se describe en el presente documento el uso de dichos genes recombinantes o vector de suministro genético de partículas poliomavíricas para restaurar la tolerancia inmunitaria *in vivo*. La restauración de la tolerancia inmunitaria se puede demostrar experimentalmente de la siguiente manera: se administra a los modelos animales de enfermedad autoinmunitaria un gen o vector recombinante como se describe en el presente documento, que codifica
35 uno o múltiples autoantígenos o partes antigénicas de los mismos que están implicados en la destrucción celular autoinmunitaria en dichos modelos animales. Como resultado, la tolerancia inmunitaria a los autoantígenos se restaura y se detiene la progresión de los síntomas de la enfermedad autoinmunitaria en los animales tratados.

La descripción también proporciona composiciones que comprenden genes recombinantes o vectores poliomavíricos y los usos de los mismos como tratamiento para enfermedades autoinmunitarias. La composición farmacéutica
40 puede comprender una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más genes recombinantes, o uno o más vectores poliomavíricos tales como vectores de SV40, y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas como se describen en el presente documento se pueden formular de cualquier forma adecuada para la administración al individuo que necesite las mismas. Dichas formulaciones pueden estar en cualquier forma para la administración tal como para la administración tópica, parenteral, intranasal, intraocular, intravenosa, intramuscular, intralinfática, subcutánea o transdérmica.
45

Las composiciones farmacéuticas como se describen en el presente documento comprenden en general un agente tampón, un agente que ajuste la osmolaridad de las mismas, y opcionalmente, uno o más vehículos, excipientes y/o aditivos farmacéuticamente aceptables como se conoce en la técnica. Se pueden incorporar también principios
50 activos suplementarios a las composiciones como se describe en el presente documento. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, un poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales. Se puede mantener una fluidez correcta mediante el uso de un revestimiento, tal como lecitina, para el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en el caso de la dispersión y por el uso de tensioactivos.

En resumen, la descripción proporciona lo siguiente:
55 Un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno bajo el control transcripcional de un promotor poliomavírico temprano y/o tardío, para su uso en la inducción de una tolerancia inmunitaria hacia el antígeno en un organismo huésped. Esto también se puede establecer como que el procedimiento que se describe en el presente documento proporciona un procedimiento para la inducción de una tolerancia autoinmunitaria hacia el antígeno en un organismo huésped, en el que se administra un vector al organismo huésped, en el que el vector

comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno bajo el control transcripcional de un promotor poliomavérico temprano y tardío de longitud completa.

Se prefiere que el antígeno esté bajo el control de un promotor poliomavérico temprano y tardío de longitud completa, tal como el promotor de SV40 temprano y tardío de longitud completa de acuerdo con las SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 1.

De manera ventajosa, el antígeno en el procedimiento mencionado anteriormente es un autoantígeno. Esto permite el tratamiento de varias enfermedades autoinmunitarias. De manera ventajosa el autoantígeno se selecciona de entre el grupo que consiste en la cadena ligera de neurofilamento (NFL) y la actinina alfa, forminotransferasa ciclodesaminasa, transglutaminasa tisular, colágeno tipo IV, tiroglobulina, glicoproteínas plaquetarias IIb/IIIa, Ib/IX, la/IIa y IV, factor de crecimiento endotelial, el receptor de acetilcolina, acuaporina 4, componentes del complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), glicoproteína mielínica del oligodendrocito, proteína mielínica básica, miembro 1 del complejo receptor SNAP de Golgi, queratina, colágeno tipo II, proinsulina y ácido glutámico decarboxilasa 65, elastina, alfa-fodrina, el receptor de glutamato tipo 3 (GluR3), histidil-ARNt-sintetasa, proteína C unida a miosina, cochlina, beta-tectorina, arrestina, colágeno tipo I y proteína de unión al interfotorreceptor retinoide.

El término "antígeno" puede referirse a cualquier sustancia (como un inmunógeno o un hapteno) que sea capaz de desencadenar una respuesta inmunitaria sea solo o después de formar un complejo con una molécula más grande por ejemplo una proteína y que sea capaz de unirse con un producto (como un anticuerpo o linfocito T) de la respuesta inmunitaria. Se prefiere que el antígeno sea un autoantígeno. El término "autoantígeno" se utiliza en el presente documento para indicar un antígeno derivado del propio cuerpo en oposición a los no autoantígenos que son ajenos al cuerpo en el que se desencadena una respuesta inmunitaria. El término "antígeno" o "autoantígeno" no se debería considerar tan estrechamente como que sea necesario que consista en un antígeno de longitud completa tal como una proteína glicoproteína o polisacárido de longitud completa. Es suficiente cuando el antígeno consiste en una parte antigénica o una parte inmunogénica del autoantígeno de longitud completa. Por ejemplo, si solo se utiliza una parte de un antígeno o autoantígeno de longitud completa, es suficiente cuando la parte comprende un epítipo contra el que se va a inducir la tolerancia inmunitaria. Para uso general, es suficiente un fragmento de al menos 6 aminoácidos, tal como 7, 8,9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más aminoácidos. Más preferido es el uso de fragmentos más largos, más preferido es el uso del antígeno de longitud completa que comprende muchos si no todos los epítipos.

También se describe en el presente documento que el autoantígeno es hipocretina-1 u orexina.

Los procedimientos descrito en el presente documento se pueden emplear de manera ventajosa en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria seleccionada de entre el grupo que consiste en enfermedades neurológicas, demencia de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, trastorno bipolar, depresión, epilepsia, enfermedad de Lyme, atrofia sistémica múltiple, esclerosis múltiple, miastenia gravis, narcolepsia, neuromielitis óptica, enfermedad de Parkinson, esquizofrenia, enfermedades metabólicas, diabetes, diabetes tipo 2, tiroiditis de Hashimoto, obesidad, enfermedades oftalmológicas, degeneración macular relacionada con la edad, glaucoma, uveítis, enfermedades gastroentéricas, enfermedades intestinales inflamatorias, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, enfermedades dermatológicas, psoriasis, escleroderma, vitíligo, enfermedades cardiovasculares, aterosclerosis, cardiomiopatía, miocarditis de Coxsackie, artritis reumatoide y fiebre reumática.

Adicionalmente, la enfermedad autoinmunitaria se puede seleccionar de entre la diabetes tipo 1, retinitis pigmentaria, amaurosis congénita de Leber, distrofia macular de Stargardt, acromatopsia, retinosquiasis y distrofia macular viteliforme, enfermedades ortopédicas, lupus eritematoso, enfermedades musculares, polimiositis, dermatomiositis, miositis con cuerpos de inclusión, distrofia muscular de Duchenne, distrofia muscular de Becker, miopatía de Miyoshi, distrofia muscular de las cinturas, distrofia muscular congénita, distrofia muscular distal, distrofia muscular de Emery-Dreyfuss, distrofia muscular fascio-escapulohumeral, distrofia muscular miotónica y distrofia muscular oculofaríngea.

En otro procedimiento que se describe en el presente documento, el huésped es un ser humano.

Un uso particularmente ventajoso incluye la administración al huésped de un vector que comprende un promotor poliomavérico temprano y tardío de longitud completa y un ácido nucleico que codifica un antígeno en el que la expresión del antígeno está bajo el control transcripcional del promotor poliomavérico temprano y tardío de longitud completa de acuerdo con la SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 1.

Los vectores que ese describen en el presente documento se pueden administrar por vía intravenosa. Es particularmente preferido un vector SV40 deficiente en replicación.

La tecnología descrita en el presente documento se describirá ahora adicionalmente en referencia a los siguientes ejemplos:

Ejemplo**Ejemplo 1: Construcción de un vector de destino SV40 deficiente en replicación (pSVac-dest).**

Se diseñaron ocho oligonucleótidos:

- 5 WdV101: CCGCTCGAGTTGCGGCCGCTGTGCCTTCTAGTTGCCAGC CATC (SEQ ID NO: 2) (que contiene un sitio de restricción XhoI y NotI) y WdV102: GGTACCATAGAGCCACCGCATCCCAGCATGCC (SEQ ID NO: 3) (que contiene un sitio de restricción KpnI) y WdV103: GGCCGCTTTATTAATTAAGCCCTGCAGGTTGTTAAACTTGGCGCGCCTTAT (SEQ ID NO: 4) (que contiene desde 5' a 3' secuencialmente un sitio de restricción pegado NotI, un sitio de restricción intacto PaeI, SbfI, PmeI y Ascl y un sitio de restricción pegado ClaI) y WdV104: CGATAAGGCGCGCCAAGTTTAAACAACCTGCAG-
 10 GGCTTAATTAATAAAGC (SEQ ID NO: 5) (contiene desde 3' a 5' secuencialmente un sitio pegado NotI, un sitio de restricción intacto PaeI, SbfI, PmeI y Ascl y un sitio de restricción pegado ClaI) y WdV105: CGGGATCCAGACATGATAA-GATACATTG (SEQ ID NO: 6) (que contiene un sitio de restricción BamHI) y WdV106: ATAGTTTAGCGGCCGCAATGAAT-GCAATTGTTGTTGTTAACTTG (SEQ ID NO: 7) (que contiene un sitio de restricción NotI) y WdV108: TGGCGCGCCTAT-AGGGAGACCCAAGCTGGCTAG (SEQ ID NO: 8) (que contiene un sitio de restricción Ascl) y WdV109 : CAATCATAC-CGTTTAAACGAACCGCGGGCCCTCTAGAC (SEQ ID NO: 9) (que contiene un sitio de restricción PmeI).

- El ADN plasmídico purificado del vector SV40 pSL-PL (De La Luna S. y col., Journal of General Virology 74: 535-539, 1993) se sometió a PCR utilizando los oligonucleótidos WdV105 y WdV106. El fragmento de ADN amplificado resultante comprendía la señal de poliadenilación flanqueada por un sitio de restricción BamHI en el extremo 5' y un sitio de restricción NotI en el extremo 3'. Este fragmento de señal de poliadenilación de SV40 se digirió con BamHI y NotI y el fragmento de ADN de 150 pares de bases de longitud se aisló a partir de un gel de agarosa y se clonó en un plásmido pBluescript SK (Stratagene) digerido de la misma manera, dando lugar al pAM002.

- El ADN plasmídico purificado pEF5/FRT/5-DEST (Invitrogen) se sometió a PCR utilizando los oligonucleótidos WdV101 y WdV102. El fragmento de ADN amplificado resultante que comprendía la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (BGH) flanqueada por secuencialmente un sitio de restricción XhoI y NotI en el extremo 5' y un sitio de restricción KpnI en el extremo 3'. Este fragmento de señal de poliadenilación BGH se digirió con KpnI y NotI, y el fragmento de ADN de 250 pares de bases de longitud resultante se aisló a partir de un gel de agarosa y se ligó en el plásmido pAM002 digerido de la misma manera. La transformación con esta mezcla de unión se llevó a cabo en una cepa de *E. coli* insensible a la metilación. Esto daba como resultado el plásmido pAM003.

- Los dos oligonucleótidos complementarios WdV103 y WdV104 se hibridaron incubándolos en un baño de agua que se enfriaron autónomamente desde la temperatura de ebullición a la temperatura ambiente, dando lugar a un engarce de ADN que contenía secuencialmente un sitio de restricción pegado NotI, sitios de restricción PaeI, SbfI, PmeI y Ascl intactos y un sitio de restricción pegado ClaI. Este engarce se ligó en el plásmido pAM003 que se digirió con NotI y ClaI y se aisló de un gel de agarosa. La mezcla de unión se utilizó posteriormente para transformar una cepa de *E. coli* insensible a la metilación, dando lugar al pAM004.

El ADN plasmídico purificado del vector pSL-PL de SV40 se digirió con ClaI y BamHI. El fragmento de ADN resultante de 2,6 kilopares de bases que contiene el origen de SV40 y la región tardía de SV40 se purifica a partir de agarosa y se lona en el pAM004 digerido de la misma manera. Esto da como resultado el nuevo vector plasmídico de SV40 pAM005.

- El ADN plasmídico purificado pEF5/FRT/5-DEST (Invitrogen) se somete a PCR utilizando los oligonucleótidos WdV108 y WdV109. El fragmento de ADN amplificado resultante comprende el casete de recombinación Gateway que incluye el gen ccdB y el gen de resistencia al cloranfenicol flanqueados por secuencias de recombinación AttR1 y AttR2. Estos a su vez están flanqueados por un sitio de restricción Ascl en el extremo 5' y un sitio de restricción PmeI en el extremo 3'. Este fragmento se digirió posteriormente con Ascl y PmeI, y el fragmento de ADN de 1844 pares de bases de longitud resultante se aisló de un gel de agarosa y se ligó en el plásmido pAM005 digerido de la misma manera, dando como resultado el pAM006 (pSVac-dest).

La clonación correcta del casete se confirmó mediante secuenciación. Se confirmó la funcionalidad mediante recombinación satisfactoria de los transgenes y demostrando que el gen de resistencia al cloranfenicol y el ccdB del casete Gateway eran funcionales.

Ejemplo 2: Clonación molecular de un vector de expresión SV40 que codifica luciferasa (SVLuc)

El plásmido de expresión pGL3 (Promega) se utilizó como matriz para la clonación de la luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*) en el vector de destino pSVac mediante PCR. Se diseñaron dos oligonucleótidos:

- WdV-070: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATGGAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAG GC (SEQ ID NO: 10) y
 55 WdV-071: GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTACACGGCGATCTTCCGCCCTTC (SEQ ID NO: 11) que contienen respectivamente las secuencias de recombinación AttB1 y AttB2.

El ADN plasmídico pGL3 se sometió a PCR utilizando los oligonucleótidos WdV070 y WdV071. El producto de la PCR purificado se recombinó posteriormente por una reacción BP en pDONT221 (Invitrogen) para crear un clon de entrada de luciferasa, pAM007. Este clon de entrada se utilizó para una reacción LR gateway para recombinar la secuencia codificante de luciferasa de luciérnaga en el pSVac-dest (pAM006), dando como resultado el vector plasmídico pSVLuc (pAM008).

Ejemplo 3: Clonación molecular de un vector de expresión SV40 que codifica la glicoproteína mielínica de oligodendrocito (SVMOG)

La secuencia de ADN codificante de la glicoproteína mielínica de oligodendrocito humana (MOG, ID genético del NCBI 4340) flanqueada por los sitios de recombinación AttB1 y AttB2 se sintetizaron químicamente (GeneArt). El fragmento de ADN se recombinó posteriormente mediante una reacción BP en un pDONR221 para crear un clon de entrada de MOG, pAM009. Este clon de entrada se utilizó para una reacción LR gateway para recombinar la secuencia codificante de MOG en el psVac-dest (pAM006), dando como resultado el vector plasmídico pSVMOG (pAM010).

Ejemplo 4: Producción y purificación de partículas SVLuc y SVMOG

El vector de ADN de SV40 que codifican la proteína MOG humana y la luciferasa de luciérnaga (pSVMOG y pSVLuc) se digirieron con NotI para retirar el armazón bacteriano. El vector ADN de SV40 se aisló del gel de agarosa y se purificó. Posteriormente, la secuencia del vector SV40 se volvió a circularizar utilizando una ligasa T4 y se utilizó para transfectar células Super-Vero cultivadas en botellas giratorias (área de cultivo: 850 centímetros cuadrados; Greiner Bio One) con un 20-70 por ciento de confluencia en medio OptiPRO® libre de suero que contenía L-glutamina 200 milimolar a 37 grados Celsius y un 5 por ciento de dióxido de carbono. Super-Vero es una línea celular empaquetada modificada genéticamente que se generó por la introducción del gran antígeno T polioma vírico SV40 en las células Vero.

Las células SuperVero sustentan la replicación de los vectores SV40 deficientes en replicación (rSV40) como se describe con detalle en la solicitud de patente WO/2010/122094.

Tres y seis días después de la transfección, el medio de cultivo que contenía las partículas de vector se recolectó y se reemplazó con medio reciente. El medio de cultivo agrupado que contenía SVMOG o SVLuc se purificaron utilizando un filtro de membrana doble (filtro Polysep II de 1/0,5 micrómetros, Millipore) y se concentró 10 veces mediante ultrafiltración/diafiltración (UFDF), se llevó a cabo una filtración de flujo tangencial utilizando una membrana con un punto de corte de un peso molecular de 300 kilodaltons (Pall Corporation). Finalmente, el material de vector se filtró a través de un filtro Acrodisc de 0,45 micrómetros, se hicieron alícuotas y almacenaron a 4 grados Celsius.

Para aumentar adicionalmente la cantidad de partículas de vector agrupadas, se utilizó el vector en (al menos) dos rondas posteriores de transducción. En cada ronda de transducción, las células SuperVero se transdujeron con 400 genomas de vector SVMOG o SVLuc por célula. Tres y seis días después de la transducción, se recolectó el medio de cultivo que contenía partículas rSV40 y se reemplazó por medio reciente. Después de la última ronda de amplificación, el medio de cultivo agrupado se purificó y concentró como se ha descrito anteriormente.

Se llevó a cabo una tercera ronda de transducción en al menos 40 botellas rotatorias (área de cultivo: 850 centímetros cuadrados) que contenía células SuperVero con un 20-70 por ciento de confluencia con 400 genomas de vector SVMOG o SVLuc por células. De nuevo, a los tres y seis días después de la transducción el medio de cultivo que contenía las partículas de vector rSV40 se recolectó y reemplazó por medio reciente. El medio de cultivo recolectado da como resultado un volumen de lote final de al menos 20 litros.

Para retirar los ácidos nucleicos no deseados (principalmente en forma de ADN de célula huésped), se añadió Benzonasa (10 unidades/mililitro, VWR internacional) en presencia de 2 milimolar de MgCl₂ y se incubó durante 1-4 horas a temperatura ambiente. El material se clarificó posteriormente utilizando un filtro de membrana doble (filtro Polysep II de 1/0,5 micrómetros) con el fin de retirar los desechos celulares. Después de la clarificación, el material se concentró 10-60 veces utilizando una etapa de UFDF, seguido por filtración a través de una membrana Millipack de 0,45 micrómetros (Millipore).

Las impurezas que permanecen se retiraron entonces del material de vector mediante una cromatografía de separación en grupo utilizando una columna de flujo rápido Sepharose 6 de 40 centímetros, 2,5 litros, AKTA explorer (GE Healthcare Life Science). Se utilizó la absorbancia ultravioleta (UV) A 260 Y 280 nanómetros para la detección de las partículas de vector que contenían el pico de vector se mezclaron y almacenaron durante una noche a 4 grados Celsius. El agrupamiento del eluido de la columna contenía partículas de vector SVMOG o SVLuc se concentró hasta aproximadamente 15 mililitros y el tampón se intercambió 10 veces mediante UFDF. Se añadieron como excipientes sacarosa (un 5 por ciento, volumen/volumen) y tween-80 (un 0,005 por ciento, volumen/volumen) y el producto en bruto concentrado se esterilizó por filtración (filtro PF Acrodisc de 0,8/0,2 micrómetros, Pall Corporation), se hicieron alícuotas en viales de cristal y se almacenó a 4 grados Celsius hasta su uso.

Ejemplo 5: Mejoría de los síntomas de EAE clínica mediante la administración profiláctica y terapéutica de SVMOG en titis (*Callithrix jacchus*)

5 Se llevó a cabo un estudio de prueba del concepto en el que se trataron seis gemelos quiméricos de médula ósea en un cuadro profiláctico: de cada pareja un hermano recibía una administración intravenosa del vector que codifica MOG (SVMOG) y el otro el vector de control que codifica la luciferasa (SVLuc). Se administró a los animales 1×10^{11} genomas de vector. Posteriormente, se indujo la EAE en los titis utilizando un péptido que consiste en los aminoácidos 34 a 45 de MOG (MOG34-56) en adyuvante incompleto de Freund (IFA; Difco Laboratories; Detroit MI)(Billiau A. y Matthys P., Journal of Leukocyte Biology 70: 849-860,2001).

10 En paralelo, se indujo la EAE en seis gemelos quiméricos de médula ósea utilizando MOG34-56 en adyuvante incompleto de Freund. Posteriormente, se trataron los animales en un cuadro terapéutico: de cada pareja un hermano recibía una administración intravenosa de SVMOG y al otro hermano se le administró el vector de control SVLuc. Se administraron a los animales 1×10^{11} genomas de vector.

15 El curso de la enfermedad resultante se caracterizó cuantificando las lesiones con inflamación y la desmielinización en la sustancia blanca y gris del sistema nervioso central (SNC). Este nuevo y altamente refinado modelo comparte similitudes clínicas, radiológicas y patológicas esenciales con la MS humana, y se ha descrito con detalle en publicaciones anteriores (Bert A. 't Hart y col., Trends in Molecular Medicine 17:119-25, 2011; Kap YS y col., Journal of Neuroimmune Pharmacology 5:220-30, 2010). La gravedad de la EAE se valoró diariamente por dos observadores independientes en una escala cuantitativa (Tabla 1).

Tabla 1. Tabla de puntuación de malestar integrada

Puntuación de molestia	Signos clínicos	Monitorización	Duración máxima
0	Asintomático. Sin signos generales de molestia	Diaria	Final del experimento
0,5	Estado de alerta reducido, pérdida de apetito, patrón de deambulación alterado sin ataxia	Diaria	20 semanas
1	Letargia y/o pérdida de peso menor del 15 % del peso de partida	Diaria	10 semanas
2	Ataxia (= capacidad reducida para mantener el equilibrio), alteración visual, neuritis óptica	Diaria	6 semanas
2,5	Parálisis incompleta: para- o monoparesia y/o pérdida sensorial y/o síndrome del tallo cerebral	Diaria	< 7 días
3,0	Parálisis completa de la parte posterior del cuerpo en un lado (hemiplejía) o los dos (paraplejía)	Diaria	< 3 días
4,0#	Parálisis completa de las cuatro extremidades (tetraplejía)	Diaria	< 18 horas
5,0#	Letargia (sin reacción a estímulos externos); incapacidad de comer o beber sin ayuda, automutilación, ceguera más de dos días, dolor intratable	Diaria	< 1 hora

#: Las puntuaciones 4 y 5 de EAE normalmente no se observaban ya que están más allá del límite ético. Sin embargo, raramente esta enfermedad progresa muy rápido. Por lo tanto, la expresión de las puntuaciones 4 y 5 se puede evitar.

20 Se descubrió que el tratamiento profiláctico y terapéutico de los titis con SVMOG mejoraba significativamente el desarrollo de los síntomas de EAE. también se descubrió que no había una respuesta inmunitaria adversa contra el antígeno MOG durante el tiempo de observación cuando el antígeno se expresaba bajo el control transcripcional del promotor de SV40 temprano y tardío, mientras que se observaba una enorme respuesta inmunitaria contra MOG en animales inmunizados con MOG34-56 en adyuvante incompleto de Freund.

Ejemplo 6: Mejoría de los síntomas de la enfermedad en otras enfermedades neurológicas degenerativas mediante la administración profiláctica y terapéutica de un vector SV40 deficiente en replicación que codifica un autoantígeno principal en el ratón (*Mus musculus*)

30 El vector SV40 de ADN recombinante que codifica uno o más autoantígenos o partes de los mismos seleccionados de entre el grupo que consiste en la cadena ligera del neurofilamento (NFL), alfa-actinina, receptor de glutamato tipo 3 (GluR3), factor de crecimiento celular endotelial, receptor de acetilcolina, hipocretina/orexina, acuaporina 4, y otros autoantígenos identificados utilizando los procedimientos de confirmación descritos anteriormente en el presente documento o utilizando otros procedimientos inmunológicos conocidos por los expertos en la técnica, se pueden construir después de la obtención del ADN que codifica los autoantígenos o partes de los mismos como se describe

en el Ejemplo 3 utilizando una síntesis química (GeneArt). El fragmento de ADN se puede posteriormente recombinar en el pSVac-dest (pAM006) mediante tecnología Gateway (Invitrogen) dando como resultado el ADN plasmídico de expresión pSVac utilizado para producir y purificar las partículas SVac que codifican dichos autoantígenos como se describe en el Ejemplo 4. Estas partículas de vector se pueden administrar por vía intravenosa en un modelo animal relevante para las enfermedades neurológicas degenerativas humanas tales como la demencia de Alzheimer, esclerosis amiotrófica lateral, trastorno bipolar, depresión, epilepsia, enfermedad de Huntington, enfermedad de Lyme, atrofia sistémica múltiple, miastenia gravis, narcolepsia, neuromielitis óptica, enfermedad de Parkinson y esquizofrenia. Se describe en el presente documento que los animales se pueden tratar en un cuadro profiláctico, aunque también se describe que los animales se pueden tratar en un cuadro terapéutico como se describe en el Ejemplo 5. El efecto terapéutico de la administración de SVac se evaluó entonces en cuanto a su capacidad para mejorar el desarrollo de los síntomas de enfermedad neurológica degenerativa. Además, la respuesta inmunitaria adversa contra el autoantígeno puede monitorizarse a lo largo del tiempo. Se descubrirá que el tratamiento profiláctico y terapéutico de animales con un vector SVac que codifica un autoantígeno principal implicado en la destrucción autoinmunitaria del tejido neural mejora significativamente el desarrollo de los síntomas de la enfermedad. También se descubrirá que no hay una respuesta inmunitaria adversa contra el autoantígeno durante el tiempo de observación cuando el autoantígeno se expresa bajo el control transcripcional del promotor de SV40 temprano y tardío.

Ejemplo 7: Mejora de los síntomas de enfermedad en enfermedades metabólicas degenerativas mediante la administración profiláctica y terapéutica de un vector SV40 deficiente en replicación que codifica un autoantígeno principal en el ratón (*Mus musculus*)

El vector SV40 de ADN recombinante que codifica uno o más autoantígenos o partes de los mismos seleccionados de entre el grupo que consiste en proinsulina, ácido glutámico descarboxilasa 65, tiroglobulina, miembro 1 del complejo receptor SNAP Golgi (GOSR1), y otros autoantígenos identificados utilizando los procedimientos de confirmación descritos anteriormente en el presente documento o utilizando otros procedimientos inmunológicos conocidos por los expertos en la técnica, se pueden construir después de la obtención del ADN que codifica los autoantígenos o partes de los mismos como se describe en el Ejemplo 3 utilizando una síntesis química (GeneArt). El fragmento de ADN se puede posteriormente recombinar en el pSVac-dest (pAM006) mediante tecnología Gateway (Invitrogen) dando como resultado el ADN plasmídico de expresión pSVac utilizado para producir y purificar las partículas SVac que codifican dichos autoantígenos como se describe en el Ejemplo 4. Estas partículas de vector se pueden administrar por vía intravenosa en un modelo animal relevante para las enfermedades metabólicas degenerativas humanas tales como diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, tiroiditis de Hashimoto y obesidad. Se describe en el presente documento que los animales se pueden tratar en un cuadro profiláctico, aunque también se describe que los animales se pueden tratar en un cuadro terapéutico como se describe en el Ejemplo 5. El efecto terapéutico de la administración de SVac se puede evaluar en cuanto a su capacidad para mejorar el desarrollo de los síntomas de enfermedad metabólica degenerativa. Además, la respuesta inmunitaria adversa contra el autoantígeno puede monitorizarse a lo largo del tiempo. Se descubrirá que el tratamiento profiláctico y terapéutico de animales con un vector SVac que codifica un autoantígeno principal implicado en la destrucción autoinmunitaria del tejido mejora significativamente el desarrollo de los síntomas de la enfermedad. También se descubrirá que no hay una respuesta inmunitaria adversa contra el autoantígeno durante el tiempo de observación cuando el autoantígeno se expresa bajo el control transcripcional del promotor de SV40 temprano y tardío.

Ejemplo 8: Mejora de los síntomas de enfermedad de enfermedades oftalmológicas degenerativas mediante la administración profiláctica y terapéutica de un vector SV40 deficiente en replicación que codifica un autoantígeno principal en el ratón (*Mus musculus*)

El vector SV40 de ADN recombinante que codifica uno o más autoantígenos o partes de los mismos seleccionados de entre el grupo que consiste en arrestina, colágeno tipo I, proteína de unión al interfotorreceptor retinoide, y otros autoantígenos identificados utilizando los procedimientos de confirmación descritos anteriormente en el presente documento o utilizando otros procedimientos inmunológicos conocidos por los expertos en la técnica, se pueden construir después de la obtención del ADN que codifica los autoantígenos o partes de los mismos como se describe en el Ejemplo 3 utilizando una síntesis química (GeneArt). El fragmento de ADN se puede posteriormente recombinar en el pSVac-dest (pAM006) mediante tecnología Gateway (Invitrogen) dando como resultado el ADN plasmídico de expresión pSVac utilizado para producir y purificar las partículas SVac que codifican dichos autoantígenos como se describe en el Ejemplo 4. Estas partículas de vector se pueden administrar por vía intravenosa en un modelo animal relevante para las enfermedades oftalmológicas degenerativas humanas tales como retinopatía autoinmunitaria, degeneración macular relacionada con la edad, glaucoma, uveítis, retinitis pigmentaria, amaurosis congénita de Leber, distrofia macular de Stargardt, acromatopsia, retinosquiasis y distrofia macular viteliforme. Se describe en el presente documento que los animales se pueden tratar en un cuadro profiláctico, aunque también se describe que los animales se pueden tratar en un cuadro terapéutico como se describe en el Ejemplo 5. El efecto terapéutico de la administración de SVac se puede evaluar en cuanto a su capacidad para mejorar el desarrollo de los síntomas de enfermedad oftalmológica degenerativa. Además, la respuesta inmunitaria adversa contra el autoantígeno puede monitorizarse a lo largo del tiempo. Se descubrirá que el tratamiento profiláctico y terapéutico de animales con un vector SVac que codifica un autoantígeno principal implicado en la destrucción autoinmunitaria del tejido retiniano mejora significativamente el desarrollo de los síntomas de la enfermedad. También se descubrirá que no hay una respuesta inmunitaria adversa contra el

autoantígeno durante el tiempo de observación cuando el autoantígeno se expresa bajo el control transcripcional del promotor de SV40 temprano y tardío.

Ejemplo 9: Mejoría de los síntomas de enfermedad de enfermedades gastrointestinales degenerativas mediante la administración profiláctica y terapéutica de un vector SV40 deficiente en replicación que codifica un autoantígeno principal en el ratón (*Mus musculus*)

El vector SV40 de ADN recombinante que codifica uno o más autoantígenos o partes de los mismos seleccionados de entre el grupo que consiste en transglutaminasa, forminotransferasa, ciclodesaminasa, y otros autoantígenos identificados utilizando los procedimientos de confirmación descritos anteriormente en el presente documento o utilizando otros procedimientos inmunológicos conocidos por los expertos en la técnica, se pueden construir después de la obtención del ADN que codifica los autoantígenos o partes de los mismos como se describe en el Ejemplo 3 utilizando una síntesis química (GeneArt). El fragmento de ADN se puede posteriormente recombinar en el pSVac-dest (pAM006) mediante tecnología Gateway (Invitrogen) dando como resultado el ADN plasmídico de expresión pSVac utilizado para producir y purificar las partículas SVac que codifican dichos autoantígenos como se describe en el Ejemplo 4. Estas partículas de vector se pueden administrar por vía intravenosa en un modelo animal relevante para las enfermedades gastroentéricas degenerativas humanas tales como enfermedad celíaca, hepatitis autoinmunitaria y enfermedades inflamatorias del intestino incluyendo la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerativa. Se describe en el presente documento que los animales se pueden tratar en un cuadro profiláctico, aunque también se describe que los animales se pueden tratar en un cuadro terapéutico como se describe en el Ejemplo 5. El efecto terapéutico de la administración de SVac se puede evaluar en cuanto a su capacidad para mejorar el desarrollo de los síntomas de enfermedad gastroentérica degenerativa. Además, la respuesta inmunitaria adversa contra el autoantígeno puede monitorizarse a lo largo del tiempo. Se descubrirá que el tratamiento profiláctico y terapéutico de animales con un vector SVac que codifica un autoantígeno principal implicado en la destrucción autoinmunitaria del tejido mejora significativamente el desarrollo de los síntomas de la enfermedad. También se descubrirá que no hay una respuesta inmunitaria adversa contra el autoantígeno durante el tiempo de observación cuando el autoantígeno se expresa bajo el control transcripcional del promotor de SV40 temprano y tardío.

Ejemplo 10: Mejoría de los síntomas de enfermedad de enfermedades dermatológicas degenerativas mediante la administración profiláctica y terapéutica de un vector SV40 deficiente en replicación que codifica un autoantígeno principal en el ratón (*Mus musculus*)

El vector SV40 de ADN recombinante que codifica uno o más autoantígenos o partes de los mismos seleccionados de entre el grupo que consiste en queratina, alfa-fodrina, y otros autoantígenos identificados utilizando los procedimientos de confirmación descritos anteriormente en el presente documento o utilizando otros procedimientos inmunológicos conocidos por los expertos en la técnica, se pueden construir después de la obtención del ADN que codifica los autoantígenos o partes de los mismos como se describe en el Ejemplo 3 utilizando una síntesis química (GeneArt). El fragmento de ADN se puede posteriormente recombinar en el pSVac-dest (pAM006) mediante tecnología Gateway (Invitrogen) dando como resultado el ADN plasmídico de expresión pSVac utilizado para producir y purificar las partículas SVac que codifican dichos autoantígenos como se describe en el Ejemplo 4. Estas partículas de vector se pueden administrar por vía intravenosa en un modelo animal relevante para las enfermedades dermatológicas degenerativas humanas tales como la psoriasis, escleroderma, síndrome de Sjögren y vitíligo. Se describe en el presente documento que los animales se pueden tratar en un cuadro profiláctico, aunque también se describe que los animales se pueden tratar en un cuadro terapéutico como se describe en el Ejemplo 5. El efecto terapéutico de la administración de SVac se puede evaluar en cuanto a su capacidad para mejorar el desarrollo de los síntomas de enfermedad dermatológica degenerativa. Además, la respuesta inmunitaria adversa contra el autoantígeno puede monitorizarse a lo largo del tiempo. Se descubrirá que el tratamiento profiláctico y terapéutico de animales con un vector SVac que codifica un autoantígeno principal implicado en la destrucción autoinmunitaria de la piel mejora significativamente el desarrollo de los síntomas de la enfermedad. También se descubrirá que no hay una respuesta inmunitaria adversa contra el autoantígeno durante el tiempo de observación cuando el autoantígeno se expresa bajo el control transcripcional del promotor de SV40 temprano y tardío.

Ejemplo 11: Mejoría de los síntomas de enfermedad de enfermedades cardiovasculares degenerativas mediante la administración profiláctica y terapéutica de un vector SV40 deficiente en replicación que codifica un autoantígeno principal en el ratón (*Mus musculus*)

El vector SV40 de ADN recombinante que codifica uno o más autoantígenos o partes de los mismos seleccionados de entre el grupo que consiste en elastina, beta-2-glicoproteína I, y otros autoantígenos identificados utilizando los procedimientos de confirmación descritos anteriormente en el presente documento o utilizando otros procedimientos inmunológicos conocidos por los expertos en la técnica, se pueden construir después de la obtención del ADN que codifica los autoantígenos o partes de los mismos como se describe en el Ejemplo 3 utilizando una síntesis química (GeneArt). El fragmento de ADN se puede posteriormente recombinar en el pSVac-dest (pAM006) mediante tecnología Gateway (Invitrogen) dando como resultado el ADN plasmídico de expresión pSVac utilizado para producir y purificar las partículas SVac que codifican dichos autoantígenos como se describe en el Ejemplo 4. Estas partículas de vector se pueden administrar por vía intravenosa en un modelo animal relevante para las enfermedades cardiovasculares degenerativas humanas tales como aterosclerosis, cardiomiopatía y miocarditis por Coxsackie. Se describe en el presente documento que los animales se pueden tratar en un cuadro profiláctico,

aunque también se describe que los animales se pueden tratar en un cuadro terapéutico como se describe en el Ejemplo 5. El efecto terapéutico de la administración de SVac se puede evaluar en cuanto a su capacidad para mejorar el desarrollo de los síntomas de enfermedad cardiovascular degenerativa. Además, la respuesta inmunitaria adversa contra el autoantígeno puede monitorizarse a lo largo del tiempo. Se descubrirá que el tratamiento profiláctico y terapéutico de animales con un vector SVac que codifica un autoantígeno principal implicado en la destrucción autoinmunitaria del tejido endotelial mejora significativamente el desarrollo de los síntomas de la enfermedad. También se descubrirá que no hay una respuesta inmunitaria adversa contra el autoantígeno durante el tiempo de observación cuando el autoantígeno se expresa bajo el control transcripcional del promotor de SV40 temprano y tardío.

Ejemplo 12: Mejoría de los síntomas de enfermedad de enfermedades ortopédicas degenerativas mediante la administración profiláctica y terapéutica de un vector SV40 deficiente en replicación que codifica un autoantígeno principal en el ratón (*Mus musculus*)

El vector SV40 de ADN recombinante que codifica uno o más autoantígenos o partes de los mismos seleccionados de entre el grupo que consiste en componentes del complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), colágeno tipo II, y otros autoantígenos identificados utilizando los procedimientos de confirmación descritos anteriormente en el presente documento o utilizando otros procedimientos inmunológicos conocidos por los expertos en la técnica, se pueden construir después de la obtención del ADN que codifica los autoantígenos o partes de los mismos como se describe en el Ejemplo 3 utilizando una síntesis química (GeneArt). El fragmento de ADN se puede posteriormente recombinar en el pSVac-dest (pAM006) mediante tecnología Gateway (Invitrogen) dando como resultado el ADN plasmídico de expresión pSVac utilizado para producir y purificar las partículas SVac que codifican dichos autoantígenos como se describe en el Ejemplo 4. Estas partículas de vector se pueden administrar por vía intravenosa en un modelo animal relevante para las enfermedades ortopédicas degenerativas humanas tales como artritis reumatoide, fiebre reumática y lupus eritematoso. Se describe en el presente documento que los animales se pueden tratar en un cuadro profiláctico, aunque también se describe que los animales se pueden tratar en un cuadro terapéutico como se describe en el Ejemplo 5. El efecto terapéutico de la administración de SVac se puede evaluar en cuanto a su capacidad para mejorar el desarrollo de los síntomas de enfermedad metabólica degenerativa. Además, la respuesta inmunitaria adversa contra el autoantígeno puede monitorizarse a lo largo del tiempo. Se descubrirá que el tratamiento profiláctico y terapéutico de animales con un vector SVac que codifica un autoantígeno principal implicado en la destrucción autoinmunitaria del tejido mejora significativamente el desarrollo de los síntomas de la enfermedad. También se descubrirá que no hay una respuesta inmunitaria adversa contra el autoantígeno durante el tiempo de observación cuando el autoantígeno se expresa bajo el control transcripcional del promotor de SV40 temprano y tardío.

Ejemplo 13: Mejoría de los síntomas de enfermedad de enfermedades musculares degenerativas mediante la administración profiláctica y terapéutica de un vector SV40 deficiente en replicación que codifica un autoantígeno principal en el ratón (*Mus musculus*)

El vector SV40 de ADN recombinante que codifica uno o más autoantígenos o partes de los mismos seleccionados de entre el grupo que consiste en histidil-ARNt-sintetasa, y otros autoantígenos identificados utilizando los procedimientos de confirmación descritos anteriormente en el presente documento o utilizando otros procedimientos inmunológicos conocidos por los expertos en la técnica, se pueden construir después de la obtención del ADN que codifica los autoantígenos o partes de los mismos como se describe en el Ejemplo 3 utilizando una síntesis química (GeneArt). El fragmento de ADN se puede posteriormente recombinar en el pSVac-dest (pAM006) mediante tecnología Gateway (Invitrogen) dando como resultado el ADN plasmídico de expresión pSVac utilizado para producir y purificar las partículas SVac que codifican dichos autoantígenos como se describe en el Ejemplo 4. Estas partículas de vector se pueden administrar por vía intravenosa en un modelo animal relevante para las enfermedades musculares degenerativas humanas tales como polimiositis, dermatomiositis, miositis con cuerpos de inclusión, distrofia muscular de Duchenne distrofia muscular de Becker, miopatía de Miyoshi, distrofia muscular de las cinturas, distrofia muscular congénita, distrofia muscular distal, distrofia muscular de Emery-Dreyfuss, distrofia muscular fascio-escapulohumeral, distrofia muscular miotónica y distrofia muscular oculofaríngea. Se describe en el presente documento que los animales se pueden tratar en un cuadro profiláctico, aunque también se describe que los animales se pueden tratar en un cuadro terapéutico como se describe en el Ejemplo 5. El efecto terapéutico de la administración de SVac se puede evaluar en cuanto a su capacidad para mejorar el desarrollo de los síntomas de enfermedad muscular degenerativa. Además, la respuesta inmunitaria adversa contra el autoantígeno puede monitorizarse a lo largo del tiempo. Se descubrirá que el tratamiento profiláctico y terapéutico de animales con un vector SVac que codifica un autoantígeno principal implicado en la destrucción autoinmunitaria del músculo mejora significativamente el desarrollo de los síntomas de la enfermedad. También se descubrirá que no hay una respuesta inmunitaria adversa contra el autoantígeno durante el tiempo de observación cuando el autoantígeno se expresa bajo el control transcripcional del promotor de SV40 temprano y tardío.

Ejemplo 14: Mejoría de los síntomas de enfermedad de enfermedades pulmonares degenerativas mediante la administración profiláctica y terapéutica de un vector SV40 deficiente en replicación que codifica un autoantígeno principal en el ratón (*Mus musculus*)

El vector SV40 de ADN recombinante que codifica uno o más autoantígenos o partes de los mismos seleccionados

de entre el grupo que consiste en elastina, beta-2-glicoproteína I, y otros autoantígenos identificados utilizando los procedimientos de confirmación descritos anteriormente en el presente documento o utilizando otros procedimientos inmunológicos conocidos por los expertos en la técnica, se pueden construir después de la obtención del ADN que codifica los autoantígenos o partes de los mismos como se describe en el Ejemplo 3 utilizando una síntesis química (GeneArt). El fragmento de ADN se puede posteriormente recombinar en el pSVac-dest (pAM006) mediante tecnología Gateway (Invitrogen) dando como resultado el ADN plasmídico de expresión pSVac utilizado para producir y purificar las partículas SVac que codifican dichos autoantígenos como se describe en el Ejemplo 4. Estas partículas de vector se pueden administrar por vía intravenosa en un modelo animal relevante para las enfermedades pulmonares degenerativas humanas tales como enfermedad pulmonar obstructiva crónica y asma. Se describe en el presente documento que los animales se pueden tratar en un cuadro profiláctico, aunque también se describe que los animales se pueden tratar en un cuadro terapéutico como se describe en el Ejemplo 5. El efecto terapéutico de la administración de SVac se puede evaluar en cuanto a su capacidad para mejorar el desarrollo de los síntomas de enfermedad pulmonar degenerativa. Además, la respuesta inmunitaria adversa contra el autoantígeno puede monitorizarse a lo largo del tiempo. Se descubrirá que el tratamiento profiláctico y terapéutico de animales con un vector SVac que codifica un autoantígeno principal implicado en la destrucción autoinmunitaria del pulmón mejora significativamente el desarrollo de los síntomas de la enfermedad. También se descubrirá que no hay una respuesta inmunitaria adversa contra el autoantígeno durante el tiempo de observación cuando el autoantígeno se expresa bajo el control transcripcional del promotor de SV40 temprano y tardío.

Ejemplo 15: Ensayo de la capacidad de promotores víricos para inducir un ARN de interferencia

La fase de lectura abierta VP35 del virus Ébola cepa Zaire se clonó en el vector de expresión de mamífero pEF5-V5-DEST que contiene el promotor EF1-alfa humano utilizando la tecnología GATEWAY (Invitrogen) como se ha descrito previamente (Haasnoot J. y col., Plos Pathogens 3: e86, 2007). Se cultivaron células renales embrionarias humanas (HEK293T) como una monocapa en DMEM (Gibco) suplementado con un 10 % de suero bovino fetal (FBS) (Gibco) a 37 grados Celsius y un 5 por ciento de CO₂. Un día antes de la transfección, las células se tripsinizaron, se resuspendieron en DMEM, y se sembraron en placas de 34 pocillos con una densidad de 1,5 x 10⁵ células por pocillo. En el momento de la transfección, las células tenían un 60 a 70 por ciento de confluencia. Se llevó a cabo la transfección por cuadruplicado utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para el ensayo de luciferasa y Renilla, las células se co-transfectaron con cantidades crecientes (0, 10, 50, 100 nanogramos) de la construcción de expresión que codifica el supresor VP35 de silenciamiento de ARN y 2 nanogramos del plásmido de expresión que codifica la luciferasa de Renilla bajo el control del promotor temprano inmediato de CMV (pRL-CMV), 100 nanogramos de plásmido de expresión que codifica la luciferasa de luciérnaga bajo el control transcripcional del promotor de SV40 temprano (pGL3) o 100 nanogramos de plásmido de expresión que codifica la luciferasa de luciérnaga bajo el control transcripcional del promotor de SV40 temprano y tardío de longitud completa (SVLuc, SEQ ID NO: 12). Los lisados de las células cultivadas se prepararon 2 días después de la transfección de la siguiente manera: El medio de cultivo celular se retiró y las células se aclararon con 100 microlitros de solución salina tampón de fosfato (PBS). Las células se lisaron entonces en 100 microlitros de 1x de Tampón de Lisis Pasivo (PLB, Promega) agitando durante 30 minutos a temperatura ambiente. La luciferasa de luciérnaga o Renilla se midió en 10 microlitros de sobrenadante con el sistema de ensayo indicador de luciferasa dual (Promega).

Las células HEK293T transfectadas con los plásmidos en los que la expresión genética indicadora se dirigió por el promotor temprano inmediato de CMV o el promotor temprano de SV40 (pRL-CMV y pGL3), en presencia de un plásmido de expresión que codifica un supresor vírico del ARN de interferencia; VP35, acumulan altas cantidades de proteína indicadora de una manera dependiente de la dosis (Figuras 1A y B respectivamente). Las células HEK2935T transfectadas con plásmidos en los que la expresión genética del indicador era dirigida por el promotor de SV40 temprano y tardío de longitud completa (SVLuc, SEQ ID NO: 12) acumulaban altas cantidades del gen indicador independientemente de la presencia o ausencia de VP35 (Figura 1C). A partir de estos experimentos se puede concluir que el promotor temprano inmediato CMV y el promotor temprano de SV40 induce un ARN de interferencia. El promotor de SV40 temprano y tardío de longitud completa no induce un ARN de interferencia en células de mamífero.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Amarna Holding BV

<120> Procedimiento para la restauración de la tolerancia inmunitaria in vivo

<130> 253 WO

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 535
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 1

	tgatatctgc agaattccac cacactggac tagtggatcc gagctcggta ccaagcttac	60
	ctagccagct tgggtctccc tatagggcgcg ccagttcgcg atgctgatca cgtagatott	120
	gcatcgataa gctttttgca aaagcctagg cctccaaaa agcctcctca ctacttctgg	180
	aatagctcag aggcogaggc ggcctcggcc tctgcataaa taaaaaaaaat tagtoagcca	240
	tggggcggag aatgggcgga actgggcgga gttaggggcg ggatgggcgg agttaggggc	300
	gggactatgg ttgctgacta attgagatgc atgctttgca tacttctgcc tgotggggag	360
	cctggggact ttccacacct ggttgctgac taattgagat gcatgctttg catacttctg	420
	cctgctgggg agcctgggga cttccacac cctaactgac acacattcca cagctggttc	480
5	tttcgcctc agaaggtacc taaccaagtt cctctttcag aggttatttc aggcc	535

<210> 2
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10 <400> 2
 ccgctcgagt tgcggccgct gtgccttcta gttgccagcc atc 43

<210> 3
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

15 <400> 3
 ggtaccatag agcccaccgc atccccagca tgcc 34

<210> 4
 <211> 52
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

20 <400> 4
 ggccgcttta ttaattaagc cctgcagggt gtttaaactt ggccgcctt at 52

<210> 5
 <211> 50
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

25 <400> 5
 cgataaggcg cgccaagttt aaacaacctg cagggcttaa ttaataaagc 50

<210> 6
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

30 <400> 6
 cgggatccag acatgataag atacattg 28

<210> 7
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5 <400> 7
 atagtttagc ggccgcaatg aatgcaattg ttgtgttaa ctg 44

<210> 8
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10 <400> 8
 tggcgcgcct ataggagac ccaagctggc tag 33

<210> 9
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

15 <400> 9
 caatcatacc gtttaaacga accgcgggcc ctctagac 38

<210> 10
 <211> 59
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

20 <400> 10
 ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggcta tggaagacgc caaaaacata aagaaaggc 59

<210> 11
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

25 <400> 11
 ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtt tacacggcga tctttccgcc cttc 54

<210> 12
 <211> 407
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

30 <400> 12

aagctttttg caaaagccta ggcctccaaa aaagcctcct cactacttct ggaatagctc 60
agaggccgag gggcctcgg cctctgcata aataaaaaaa attagtcagc catggggcgg 120
agaatgggcg gaactgggcg gagttagggg cgggatgggc ggagttaggg gcgggactat 180
ggttgctgac taattgagat gcatgctttg catacttctg cctgctgggg agcctgggga 240
ctttccacac ctggttgctg actaattgag atgcatgctt tgcatacttc tgcoctgctgg 300
ggagcctggg gactttccac accctaactg acacacatte cacagctggt tctttccggc 360
tcagaaggta cctaaccaag ttctcttttc agaggttatt tcaggcc 407

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una partícula de vector SV40 deficiente en replicación que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un autoantígeno bajo el control transcripcional de un promotor de SV40 temprano y tardío de longitud completa de acuerdo con la SEQ ID NO: 12, para su uso en un procedimiento de tratamiento induciendo una tolerancia inmunitaria hacia el autoantígeno en un organismo huésped.
- 10 2. Una partícula de vector SV40 deficiente en replicación para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el autoantígeno se selecciona de entre el grupo que consiste en alfa-fodrina, arrestina, cadena ligera de neurofilamento, alfa-actinina, beta-2-glicoproteína I, cochlina, beta-tectorina, elastina, el receptor de glutamato tipo 3, forminotransferasa ciclodesaminasa, transglutaminasa tisular, colágeno tipo I, colágeno tipo II, colágeno tipo IV, proteína de unión al interfotorreceptor retinoide, tiroglobulina, glicoproteínas específicas de plaquetas IIb/IIIa, Ib/IX, Ia/IIa y IV, factor de crecimiento celular endotelial, proteína C de unión a miosina, histidil-ARNt-sintetasa, el receptor de acetilcolina, hipocretina-1/orexina, acuaporina 4, componentes del complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), glicoproteína mielínica del oligodendrocito, proteína mielínica básica, miembro 1 del complejo de receptor SNAP Golgi, queratina, proinsulina y ácido glutámico descarboxilasa 65, elastina, el receptor de glutamato tipo 3 (GluR3), proteína de unión al interfotorreceptor retinoide o una parte antigénica de esta.
- 15 3. Una partícula de vector SV40 deficiente en replicación para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que el huésped tiene una enfermedad seleccionada de entre el grupo que consiste en enfermedades neurológicas que consisten en demencia de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, trastorno bipolar, depresión, epilepsia, enfermedad de Huntington, enfermedad de Lyme, atrofia sistémica múltiple, esclerosis múltiple, miastenia gravis, narcolepsia, neuromielitis óptica, enfermedad de Parkinson, esquizofrenia, diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, tiroiditis de Hashimoto, obesidad, enfermedades oftalmológicas que consisten en retinopatía autoinmunitaria, degeneración macular relacionada de la edad, glaucoma, uveítis, retinitis pigmentaria, amaurosis congénita de Leber, distrofia macular de Stargardt, acromatopsia, retinosquiasis, distrofia macular viteliforme, enfermedades gastroentéricas que consisten en enfermedad celíaca y enfermedades intestinales inflamatorias incluyendo la enfermedad de Crohn,
- 20 25 colitis ulcerativas, psoriasis, escleroderma, síndrome de Sjögren, vitíligo, enfermedades cardiovasculares, aterosclerosis, cardiomiopatía, miocarditis por Coxsackie, enfermedades ortopédicas, artritis reumatoide, fiebre reumática, lupus eritematoso, enfermedades musculares, polimiositis, dermatomiositis, miositis con cuerpo de inclusión, distrofia muscular de Duchenne, distrofia muscular de Becker, miopatía de Miyoshi, distrofia muscular de la cintura y extremidades, distrofia muscular congénita, distrofia muscular distal, distrofia muscular de Emery-Dreyfuss, distrofia muscular fascio-escapulohumeral, distrofia muscular miotónica, distrofia muscular oculofaríngea, enfermedades pulmonares, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y asma.
- 30 4. Una partícula de vector SV40 deficiente en replicación para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el huésped es un ser humano.
- 35 5. Una partícula de vector SV40 deficiente en replicación para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el uso incluye la administración al huésped de una partícula de vector SV40 deficiente en replicación que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un autoantígeno bajo el control transcripcional de un promotor de SV40 temprano y tardío de longitud completa de acuerdo con la SEQ ID NO: 12.
- 40 6. Una partícula de vector SV40 deficiente en replicación para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la partícula de vector se administra por vía intravenosa.

Figura 1

