

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 745 470**

51 Int. Cl.:

C12N 15/86 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C12N 9/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.04.2012 PCT/US2012/031896**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.10.2012 WO12135857**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.04.2012 E 12763234 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2019 EP 2691529**

54 Título: **Partícula de AAV2 que comprende una proteína de la cápside de AAV2 y un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una tripeptidilo peptidasa 1 (TPP1) para el tratamiento de lipofuscinosis ceroide infantil tardía (LINCL) en un mamífero no roedor mediante inyección intraventricular o administración icv**

30 Prioridad:

31.03.2011 US 201161470460 P

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

02.03.2020

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF IOWA RESEARCH FOUNDATION
(100.0%)
112 N. Capitol Street, 6 Gilmore Hall
Iowa City, Iowa 52242-5500, US**

72 Inventor/es:

DAVIDSON, BEVERLY L.

74 Agente/Representante:

SUGRAÑES MOLINÉ, Pedro

ES 2 745 470 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

Partícula de AAV2 que comprende una proteína de la cápside de AAV2 y un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una tripeptidilo peptidasa 1 (TPP1) para el tratamiento de lipofuscinosis cerioide infantil tardía (LINCL) en un mamífero no roedor mediante inyección intraventricular o administración icv.

Antecedentes de la invención

[0001] La transferencia de genes es reconocida actualmente como una herramienta poderosa para el análisis de eventos biológicos y procesos de enfermedad, tanto a nivel celular como molecular. Más recientemente, ha recibido considerable atención la aplicación de una terapia génica para el tratamiento de enfermedades en humanos, ya sean heredadas (por ejemplo, deficiencia de ADA) o adquiridas (por ejemplo, un cáncer o una enfermedad infecciosa). Con el surgimiento de técnicas mejoradas de transferencia de genes y la identificación de una biblioteca en crecimiento constante de enfermedades relacionadas con genes defectuosos, la terapia génica ha evolucionado rápidamente desde una teoría de tratamiento hasta una realidad práctica.

[0002] Tradicionalmente, la terapia génica se ha definido como un procedimiento mediante el cual se introduce un gen exógeno en las células de un paciente con el fin de corregir un error genético congénito. Aunque actualmente hay más de 4500 enfermedades en humanos que se clasifican como genéticas, se han identificado relativamente pocas mutaciones específicas para estas enfermedades en el genoma humano. Hasta hace poco, estas enfermedades genéticas raras representaban los blancos exclusivos de los esfuerzos para el desarrollo de una terapia génica. Por lo tanto, la mayoría de los protocolos de terapias génicas aprobados por el NIH hasta la fecha estuvieron dirigidos a la introducción de una copia funcional de un gen defectuoso en las células somáticas de un individuo que tiene un error genético congénito conocido. Tan solo recientemente es que los investigadores y médicos clínicos han comenzado a apreciar que la mayoría de los cánceres humanos, algunas formas de enfermedades cardiovasculares y muchas enfermedades degenerativas también tienen importantes componentes genéticos y, a los efectos de diseñar nuevas terapias génicas, deberían considerarse como "trastornos genéticos". Por ello, más recientemente la terapia génica se ha definido ampliamente como la corrección de un fenotipo de enfermedad por medio de la introducción de información genética nueva en el organismo afectado.

[0003] En una terapia génica *in vivo*, se introduce un gen transferido en las células del organismo receptor *in situ* es decir, dentro del receptor. Las terapias génicas *in vivo* fueron examinadas en varios modelos de animales. En varias publicaciones recientes se ha informado la posibilidad de dirigir la transferencia de genes *in situ* a órganos y tejidos tales como músculos, células madre hematopoyéticas, la pared arterial, el sistema nervioso y los pulmones. También se ha descrito que la inyección directa de ADN en la musculatura esquelética, el músculo cardíaco y la inyección de complejos de ADN-lípido en la vasculatura permite obtener un nivel de expresión detectable de uno o más productos del gen insertado *in vivo*.

[0004] El tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central, por ejemplo, las enfermedades genéticas heredadas del cerebro, continúa siendo un problema irresoluble. Los ejemplos de las mismas son las enfermedades por almacenamiento lisosómico. En su conjunto, la incidencia de enfermedades por almacenamiento lisosómico (LSD) es de 1 por cada 10.000 nacimientos en todo el mundo, y en el 65% de los casos, hay un compromiso significativo del sistema nervioso central (SNC). Las proteínas deficientes en estos trastornos, cuando se administran por vía intravenosa, no atraviesan la barrera hematoencefálica o, cuando se administran directamente en el cerebro, no se distribuyen ampliamente. Por consiguiente, se necesita desarrollar terapias para los déficits del SNC.

[0005] Watson et al., *Gene Therapy*, volumen 13, 2006, páginas 917-925, describen el uso de vectores de AAV recombinante para administrar una proteína terapéutica en el cerebro de un mamífero roedor que lo necesita. Más específicamente, Watson et al., describen el uso de un vector AAVr-IDUA empaquetado en una cápside de AAV2 para tratar una enfermedad por almacenamiento lisosómico (LSD) en ratones adultos, en donde la LSD es una mucopolisacaridosis tipo I y el vector se administra mediante inyección intratecal.

[0006] Passini et al., *Journal of Virology*, volumen 77, 2003, páginas 7034-7040, describen el uso de vectores de AAV recombinante para administrar una proteína terapéutica en el cerebro de un mamífero roedor que lo necesita, en donde la partícula de AAVr se administra mediante inyección intraventricular. Más específicamente, Passini et al., describen el uso de un vector AAVr1 para tratar una LSD en ratones, en donde la proteína terapéutica es una beta-glucuronidasa y la LSD es una mucopolisacaridosis tipo VII.

[0007] Passini, et al., *J. Neurosci*, volumen 26, 2006, Nº 5, páginas 1334-1342, divulgaron AAV2CUhCLN2, un vector que comprende al ADNc CLN2 humano que codifica el gen TPP1 humano usado para la terapia génica de una lipofuscinosis cerioide neuronal infantil tardía clásica (cLINCL) en ratones CLN2^{-/-}. El vector AAV2CUhCLN2 se inyectó estereotácticamente y dio como resultado 'una reducción marcada del almacenamiento autofluorescente en las regiones del cerebro inyectadas con AAV2CUhCLN2, así como las regiones adyacentes, incluidos el cuerpo estriado y el hipocampo'.

Síntesis de la invención

[0008] La presente invención se relaciona con una partícula de AAVr2 que comprende una proteína de la cápside de AAV2 y un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína terapéutica insertada entre un par de repeticiones terminales invertidas de AAV para usar en el tratamiento de una enfermedad por almacenamiento lisosómico (LSD) en un mamífero no roedor, en donde dicha partícula de AAVr2 se administrará al mamífero no roedor mediante inyección intraventricular o administración ICV, en donde la proteína es la tripeptidilo peptidasa 1 (TPP1), en donde la LSD es una lipofuscinosis ceroides infantil tardía (LINCL) y en donde el mamífero no roedor es un perro, un primate o un humano.

[0009] Se divulga un método para administrar un ácido nucleico en una célula endodermal de un mamífero no roedor que comprende administrar en dicha célula endodermal una partícula de AAV2 que contiene un vector que comprende el ácido nucleico insertado entre un par de repeticiones terminales invertidas de AAV2, y de esa manera proveer el ácido nucleico en la célula endodermal. En determinadas formas de realización, la partícula de AAVr2 infecta la célula endodermal que no es de primate a razón de más un 20% que el índice de infectividad de AAV4, tal como a razón de más del 50% o 100%, 1000% o 2000% con respecto al índice de infectividad de AAV4.

[0010] También se divulga un método para administrar un ácido nucleico a un mamífero no roedor que comprende administrar en una célula endodermal del mamífero una partícula de AAV2 que comprende el ácido nucleico insertado entre un par de repeticiones terminales invertidas de AAV, y volver a introducir la célula endodermal en el mamífero, para de esa manera proveer el ácido nucleico al mamífero.

[0011] Además se divulga un método para administrar un ácido nucleico en una célula endodermal de un mamífero no roedor que comprende administrar al mamífero una partícula de AAV2 que comprende el ácido nucleico insertado entre un par de repeticiones terminales invertidas de AAV, para de esa manera proveer el ácido nucleico en una célula endodermal en el mamífero.

[0012] También se divulga un método para suministrar un agente en el sistema nervioso central de un mamífero no roedor, que comprende administrar en el líquido cefalorraquídeo (CSF) del mamífero no roedor una partícula de AAV2 que contiene un vector que comprende el ácido nucleico insertado entre un par de repeticiones terminales invertidas de AAV de una manera eficaz para infectar células endodermales en el mamífero no roedor de manera tal que las células endodermales secretarán el agente en el CSF del mamífero no roedor.

[0013] Además se divulga un método de tratamiento de una enfermedad en un mamífero no roedor que comprende administrar en las células endodermales del mamífero una partícula de AAV2 que contiene un vector que comprende el ácido nucleico insertado entre un par de repeticiones terminales invertidas de AAV, para de esa manera proveer el ácido nucleico en la célula endodermal.

[0014] En determinados aspectos, la enfermedad es una enfermedad por almacenamiento lisosómico (LSD). En determinados aspectos la LSD es lipofuscinosis ceroides infantil o infantil tardía, neuropática de Gaucher, Batten juvenil, Fabry, MLD, Sanfilippo A, Hunter, Krabbe, Morquio, Pompe, Niemann-Pick C, Tay-Sachs, Hurler (MPS-I H), Sanfilippo B, Maroteaux-Lamy, Niemann-Pick A, cistinosis, Hurler-Scheie (MPS-I H/S), síndrome de Sly (MPS VII), Scheie (MPS-I S), Batten infantil, gangliosidosis GM1, mucopolisidosis tipo II/III o enfermedad de Sandhoff. En determinadas formas de realización, la enfermedad es una LINCL. En determinados aspectos, la enfermedad es una enfermedad neurodegenerativa, tal como la enfermedad de Huntington, ALS, hemiplegia espástica hereditaria, esclerosis lateral primaria, atrofia muscular espinal, enfermedad de Kennedy, mal de Alzheimer, una enfermedad por repeticiones de poliglutamina o el mal de Parkinson.

[0015] En determinados aspectos, el mamífero grande es un primate, caballo, ovejas, cabras, cerdo o perro. En determinadas formas de realización, el primate es un ser humano.

[0016] En determinados aspectos, el ácido nucleico es una hidrolasa lisosómica. En determinadas formas de realización, el ácido nucleico es TPP1.

[0017] Además se divulga un método para transfectar una célula endodermal de un cerebro de mamífero no roedor que comprende administrar en el líquido cefalorraquídeo (CSF) del mamífero no roedor una partícula de AAV2 que contiene un vector que comprende un ácido nucleico insertado entre un par de repeticiones terminales invertidas de AAV2 de una manera eficaz para infectar las células endodermales en el mamífero no roedor de manera tal que las células endodermales secretarán al agente en el CSF del mamífero no roedor.

[0018] Además se divulga el uso del vector viral descrito precedentemente para preparar un medicamento que es de utilidad para tratar una enfermedad por almacenamiento lisosómico en un mamífero.

[0019] Además se divulga una célula descrita precedentemente para usar en un tratamiento o diagnóstico médico.

[0020] Además se divulga el uso de la célula descrita precedentemente para preparar un medicamento que es de

utilidad para tratar una enfermedad por almacenamiento lisosómico en un mamífero.

Descripción breve de las figuras

- 5 [0021] En la **Figura 1** se muestra la transfección de AAVeGFP en perros.
 En la **Figura 2** se muestra la transfección de AAVeGFP en el cerebro de primates no humanos.
 En la **Figura 3** se muestra que la transducción epidural de TPP1 en un cerebro NHP, indicó un aumento significativo de la enzima en el CSF.
 En la **Figura 4** se muestra una actividad elevada de TPP1 en varias regiones del cerebro.
 10 En la **Figura 5** se muestran los resultados del desempeño en el laberinto en T de perros control y tratados. Los círculos claros representan a los perros afectados; los cuadrados oscuros son los perros normales y los círculos oscuros representan un perro TPP1-/- tratado con AAV2-CLN2.
 La **Figura 6A** es un alineamiento de proteínas AAV2 (SEQ ID N°: 1) y AAV4 (SEQ ID N°: 2) y la **Figura 6B** es un alineamiento de los nucleótidos de AAV2 (SEQ ID N°: 3) y AAV4 (SEQ ID N°: 4) basado en la secuencia de AAV2 (NC_001401) y AAV4 (NC_001829).
 15

Descripción detallada

20 [0022] La presente invención se relaciona con una partícula de AAVr2 que comprende una proteína de la cápside de AAV2 y un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína terapéutica insertada entre un par de repeticiones terminales invertidas de AAV para usar en el tratamiento de una enfermedad por almacenamiento lisosómico (LSD) en un mamífero no roedor, en donde dicha partícula de AAVr2 se administrará al mamífero no roedor mediante inyección intraventricular o administración ICV, en donde la proteína es tripeptidilo peptidasa 1 (TPP1), en donde la LSD es una lipofuscinosis ceroides infantil tardía (LINCL) y en donde el mamífero no roedor es un perro, un primate o un humano.
 25

[0023] El virus adeno-asociado (AAV) es un virus no patógeno pequeño de la familia Parvoviridae. El AAV es distinto de los otros miembros de esta familia debido a su dependencia de un virus ayudante para su replicación. En la ausencia de un virus ayudante, el AAV se puede integrar de una manera específica del locus en el brazo q del cromosoma 19. El genoma de aproximadamente 5 kb del AAV consiste en un segmento de ADN de hebra simple de polaridad ya sea más o menos. Los extremos del genoma son repeticiones terminales invertidas cortas que se pueden plegar como estructuras en horquilla y sirven como origen de la replicación del ADN viral. Físicamente, el virión del parvovirus no tiene envoltura y su cápside icosaédrica es de aproximadamente 20 nm de diámetro.
 30

[0024] Hasta la fecha se han identificado ocho AAV serológicamente distintos y se han aislado de ellos de humanos o primates y se denominan tipos de AAV 1-5. Govindasamy et al., "Structurally Mapping the Diverse Phenotype of Adeno-Associated Virus Serotype 4", *J. Vir.*, 80 (23): 11556-11570 (2006). El genoma del AAV2 es de 4680 nucleótidos de longitud y contiene dos marcos de lectura abiertos (ORF). El ORF izquierdo codifica las proteínas Rep no estructurales, Rep 40, Rep 52, Rep 68 y Rep 78, que están involucrados en la regulación de la replicación y transcripción además de la producción de genomas de progenie de hebra simple. Además, dos de las proteínas Rep se han asociado con la integración preferencial de los genomas del AAV en una región del brazo q del cromosoma 19 humano. También se ha mostrado que Rep68/78 tiene actividad de unión a NTP así como actividades ADN y ARN helicasa. Las proteínas Rep tienen una señal de localización nuclear, así como varios sitios potenciales de fosforilación. Una mutación de uno de estos sitios quinasa dio como resultado la pérdida de la actividad de replicación.
 35
 40
 45

[0025] Los extremos del genoma son repeticiones terminales invertidas cortas (ITR) que tienen la posibilidad de plegarse como estructuras en horquilla con forma de T que sirven como origen de la replicación del ADN viral. Se han descrito dos elementos dentro de la región ITR que son fundamentales para la función de la ITR, un motivo de repetición GAGC y el sitio de resolución terminal (trs). Se ha demostrado que el motivo de repetición se une a Rep cuando la ITR se encuentra en una conformación ya sea lineal o en horquilla. Esta unión sirve para posicionar a Rep68/78 para el corte en el trs que tiene lugar de una manera específica del sitio y de la hebra. Además de su rol en la replicación, estos dos elementos parecen ser fundamentales para la integración viral. En el locus de integración del cromosoma 19 hay un sitio de unión a Rep con un trs adyacente. Se ha demostrado que estos elementos son funcionales y necesarios para una integración específica del locus.
 50
 55

[0026] El virión AAV2 es una partícula que no tiene envoltura, icosaédrica, de aproximadamente 25 nm en diámetro, y que consiste en tres proteínas relacionadas denominadas VP1, VP2 y VP3. La ORF derecha codifica las proteínas de la cápside VP1, VP2 y VP3. Estas proteínas se encuentran a una relación 1:1:10, respectivamente, y todas derivan de la ORF derecha. Las proteínas de la cápside difieren entre sí en el uso de un corte y empalme alternativo y un codón de inicio poco común. El análisis de supresión ha mostrado que la eliminación o alteración de VP1 que se traduce a partir de un mensaje de corte y empalme alternativo resulta en un rendimiento reducido de partículas infectantes. Las mutaciones en la región codificante de VP3 resultan en una falla para producir cualquier ADN de progenie de hebra simple o partículas infectantes. Una partícula de AAV2 es una partícula viral que comprende una proteína de la cápside de AAV2. Un polipéptido de la cápside de AAV2 puede codificar el polipéptido VP1, VP2 y VP3 completo. La partícula puede ser una partícula que comprende AAV2 y otras proteínas de la
 60
 65

cápside de AAV (es decir, una proteína quimérica, tal como AAV4 y AAV2). En la presente se contemplan variaciones en la secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside de AAV2, siempre que la partícula viral resultante que comprende la cápside de AAV2 permanezca antigénicamente o inmunológicamente diferente del AAV4, lo cual se puede determinar rutinariamente mediante métodos estándar. Específicamente, por ejemplo, se puede emplear un ELISA y transferencias Western para determinar si una partícula viral es antigénicamente o inmunológicamente distinta de AAV4. Además, la partícula viral AAV2 preferiblemente retiene un tropismo tisular distinto de AAV4.

[0027] Una partícula de AAV2 es una partícula viral que comprende una proteína de la cápside de AAV2. Un polipéptido de la cápside de AAV2 que codifica al polipéptido VP1, VP2 y VP3 completo puede tener, globalmente, por lo menos un 63% aproximadamente de homología (o identidad) con un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos está codificada por los nucleótidos que se muestran en la SEQ ID N°: 1 (proteína de la cápside de AAV2). La proteína de la cápside puede presentar aproximadamente un 70% de homología, aproximadamente 75% de homología, 80% de homología, 85% de homología, 90% de homología, 95% de homología, 98% de homología, 99% de homología o hasta un 100% de homología con la proteína que se muestran en la SEQ ID N°: 1. La proteína de la cápside puede presentar aproximadamente un 70% de identidad, aproximadamente 75% de identidad, 80% de identidad, 85% de identidad, 90% de identidad, 95% de identidad, 98% de identidad, 99% de identidad o hasta un 100% de identidad con la proteína que se muestran en la SEQ ID N°: 1. La partícula puede ser una partícula que comprende una proteína de la cápside tanto de AAV4 como de AAV2, es decir, una proteína quimérica. En la presente se contemplan variaciones en la secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside de AAV2, siempre que la partícula viral resultante que comprende la cápside de AAV2 permanezca antigénicamente o inmunológicamente diferente del AAV4, lo cual se puede determinar rutinariamente mediante métodos estándar. Específicamente, por ejemplo, se puede emplear un ELISA y transferencias Western para determinar si una partícula viral es antigénicamente o inmunológicamente distinta de AAV4. Además, la partícula viral AAV2 preferiblemente retiene un tropismo tisular distinto de AAV4, tal como se describe en los ejemplos de la presente, aunque una partícula quimérica AAV2 que comprende por lo menos una proteína del recubrimiento de AAV2 puede tener un tropismo tisular diferente del de una partícula de AAV2 que solamente consiste en proteínas del recubrimiento de AAV2.

[0028] Tal como se muestra en las Figuras 6A y 6B, la secuencia de la cápside de AAV2 y la secuencia de la cápside de AAV4 son aproximadamente 60% homólogas entre sí. En determinadas formas de realización, la cápside de AAV2 comprende (o consiste en) una secuencia que es por lo menos 65% homóloga de la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID N°: 1.

[0029] En determinados aspectos se divulga además una partícula de AAV2 que contiene, es decir, que encapsula, un vector que comprende un par de repeticiones terminales invertidas de AAV2. La secuencia de nucleótidos de los ITR de AAV2 es conocida en el arte. Además, la partícula puede ser una partícula que comprende una proteína de la cápside tanto de AAV4 como de AAV2, es decir, una proteína quimérica. Aún más, la partícula puede ser una partícula que encapsula un vector que comprende un par de repeticiones terminales invertidas de AAV de otros AAV (por ejemplo, AAV1-AAV8). El vector encapsulado en la partícula puede comprender además un ácido nucleico exógeno insertado entre las repeticiones terminales invertidas.

[0030] Las siguientes características del AAV lo convierten en un vector atractivo para la transferencia de genes. Se ha demostrado in vitro que los vectores de AAV se integran de manera estable en el genoma celular; tienen un amplio rango de huéspedes; transducen células en división y que no están en división in vitro e in vivo y mantienen niveles de expresión altos de los genes transducidos. Las partículas virales son estables al calor, resistentes a solventes, detergentes, cambios en el pH, temperatura y se pueden concentrar sobre gradientes de CsCl. La integración de un provirus AAV no está asociada con ningún efecto negativo a largo plazo sobre el crecimiento o la diferenciación celular. Se ha demostrado que los ITR son los únicos elementos cis requeridos para la replicación, el empaquetamiento y la integración, y pueden tener algunas actividades promotoras.

[0031] Se divulgan métodos para administrar partículas de AAV2, vectores de AAV2 recombinantes y viriones de AAV2 recombinantes. Una partícula de AAV2 es una partícula viral que comprende una proteína de la cápside de AAV2. Un vector de AAV2 recombinante es una construcción de ácidos nucleicos que comprende por lo menos un ácido nucleico único de AAV2. Un virión de AAV2 recombinante es una partícula que contiene un vector AAV2 recombinante. Para considerarla incluida en el término "AAV2 ITR", la secuencia de nucleótidos debe retener una o ambas características descritas en la presente que diferencian al ITR AAV2 del ITR AAV4: (1) tres (en lugar de cuatro como en AAV4) repeticiones "GAGC" y (2) en el sitio de unión del ITR AAV2 Rep el cuarto nucleótido en las primeras dos repeticiones "GAGC" es C en lugar de T.

[0032] El promotor puede ser cualquier promotor deseado, seleccionado según consideraciones conocidas, tales como el nivel de expresión de un ácido nucleico ligado funcionalmente al promotor y el tipo de célula en el cual se usará el vector. Los promotores pueden comprender un promotor exógeno o endógeno. Los promotores pueden incluir, por ejemplo, promotores fuertes conocidos tal como SV40 o el promotor de metalotioneína inducible, o un promotor de AAV, tal como un promotor p5 de AAV. Otros ejemplos de promotores incluyen los promotores derivados de genes de actina, genes de inmunoglobulina, de citomegalovirus (CMV), adenovirus, virus del papiloma

bovino, promotores adenovirales, tal como el promotor adenoviral mayor tardío, un promotor de shock de calor inducible, del virus del sincicio respiratorio, del virus del sarcoma de Rous (RSV), etc. Específicamente, el promotor puede ser un promotor p5 de AAV2 o un promotor p5 de AAV4. Además, los fragmentos más pequeños del promotor p5 que retengan la actividad promotora se pueden determinar fácilmente mediante procedimientos estándar que incluyen, por ejemplo, la construcción de una serie de supresiones en el promotor p5, unión de supresión a un gen informante y determinación de si el gen informante se expresa, es decir, si se transcribe y/o traduce.

[0033] El vector de AAV2 puede comprender además un ácido nucleico exógeno (heterólogo) ligado funcionalmente al promotor. Un "ácido nucleico heterólogo" significa que se puede insertar cualquier ácido nucleico heterólogo o exógeno en el vector para su transferencia a una célula, tejido u organismo. El ácido nucleico puede codificar, por ejemplo, un polipéptido o una proteína o un ARN antisentido. El término "ligado funcionalmente" significa que el promotor puede promover la expresión del ácido nucleico heterólogo, como es conocido en el arte, tal como en una orientación apropiada del promotor con relación al ácido nucleico heterólogo. Además, el ácido nucleico heterólogo preferiblemente tiene todas las secuencias apropiadas para la expresión del ácido nucleico, como es conocido en el arte, para codificar funcionalmente, es decir, permitir la expresión del ácido nucleico. El ácido nucleico puede incluir, por ejemplo, secuencias de control de la expresión, tal como un potenciador y los sitios de procesamiento de información necesarios, tales como sitios de unión a ribosomas, sitios de corte y empalme de ARN, sitios de poliadenilación y secuencias terminadoras de la transcripción.

[0034] El ácido nucleico heterólogo puede codificar proteínas beneficiosas que reemplazarán a las proteínas faltantes o defectuosas requeridas por el sujeto en el cual será transferido el vector o puede codificar un polipéptido citotóxico que puede ser direccionado, por ejemplo, hacia células cancerosas u otras células cuya muerte sería beneficiosa para el sujeto. El ácido nucleico heterólogo también puede codificar ARN antisentido que se pueden unir, y de esa manera inactivar, los ARNm producidos por el sujeto que codifican proteínas perjudiciales. En una forma de realización, se pueden producir polinucleótidos antisentido a partir de un casete de expresión heterólogo en una construcción viral AAV2, donde el casete de expresión contiene una secuencia que promueve una expresión específica del tipo celular.

[0035] Los ejemplos de ácidos nucleicos heterólogos que se pueden administrar en una célula o sujeto como parte del vector AAV2 de la presente pueden incluir, pero en un sentido no taxativo, los ácidos nucleicos que codifican agentes terapéuticos, tales como hidrolasas lisosómicas; factores de necrosis tumoral (TNF), tales como TNF-alfa; interferones, tales como interferón-alfa, interferón-beta e interferón-gamma; interleuquinas, tales como IL-1, IL-1beta e ILs-2 a -14; GM-CSF; adenosina desaminasa; factores secretados tales como factores de crecimiento; canales iónicos; agentes quimioterapéuticos; proteínas lisosómicas; productos de genes anti-apoptóticos; proteínas promotores de la supervivencia neural tales como receptores de glutamato y factores de crecimiento; factores de crecimiento celulares, tales como linfoquinas; CD4 soluble; Factor VIII; Factor IX; receptores de células T; receptor LDL; ApoE; ApoC; antitripsina alfa-1; ornitina transcarbamilasa (OTC); receptor transmembrana de fibrosis quística (CFTR); insulina; receptores Fc para los dominios de unión al antígeno de anticuerpos, tales como inmunoglobulinas; y secuencias antisentido que inhiben la replicación viral, tales como secuencias antisentido que inhiben la replicación de hepatitis B o hepatitis no A, virus no B. Además, el ácido nucleico puede codificar más de un producto génico, solamente limitado por el tamaño del ácido nucleico que puede ser empaquetado.

[0036] Una partícula de AAV2 es una partícula viral que comprende una proteína de la cápside de AAV2. En la presente se contemplan variaciones en la secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside de AAV2, siempre que la partícula viral resultante que comprende la cápside de AAV2 permanezca antigénicamente o inmunológicamente diferente del AAV4, lo cual se puede determinar rutinariamente mediante métodos estándar. Específicamente, por ejemplo, se puede emplear un ELISA y transferencias Western para determinar si una partícula viral es antigénicamente o inmunológicamente distinta de otros serotipos del AAV.

[0037] El término "polipéptido", según se usa en la presente, se refiere a un polímero de aminoácidos e incluye proteínas de longitud completa y fragmentos de las mismas. Por consiguiente, los términos "proteína," polipéptido" y "péptido" a menudo se usan indistintamente en la presente. Las sustituciones se pueden seleccionar mediante parámetros conocidos para que sean neutras. Como podrán apreciar los especialistas en el arte, también se divulgan polipéptidos que presentan variaciones ligeras en cuanto a las secuencias de aminoácidos u otras propiedades. Dichas variaciones pueden surgir naturalmente como variaciones alélicas (por ejemplo, debido a un polimorfismo genético) o se pueden producir mediante intervención humana (por ejemplo, mediante mutagénesis de secuencias de ADN clonadas), tales como mutantes inducidos puntuales, de supresión, e inserción y de sustitución. En general se prefieren cambios menores en la secuencia de aminoácidos, tales como reemplazos de aminoácidos conservadores, supresiones o inserciones internas pequeñas, y adiciones o supresiones en los extremos de las moléculas. Estas modificaciones pueden resultar en cambios en la secuencia de aminoácidos, proporcionar mutaciones silentes, modificar un sitio de restricción o proveer otras mutaciones específicas.

[0038] Se divulga un método para administrar un ácido nucleico en una célula que comprende administrar en dicha célula una partícula de AAV2 que contiene un vector que comprende el ácido nucleico insertado entre un par de repeticiones terminales invertidas de AAV2, y de esa manera proveer el ácido nucleico en la célula. La administración en la célula se puede efectuar utilizando cualquier medio, que incluyen el simple contacto de la

partícula, opcionalmente contenida en un líquido deseado, tal como un medio de cultivo tisular, o una solución amortiguadora salina, con las células. Se puede dejar que la partícula permanezca en contacto con las células por cualquier extensión de tiempo deseado, y típicamente la partícula se administra y se deja que permanezca indefinidamente. Para dichos métodos *in vitro*, el virus se puede administrar a la célula mediante métodos de transducción viral estándar, como se conoce en el arte y como se describe en la presente. Los títulos de virus a administrar pueden variar, en particular dependiendo del tipo de célula, pero típicamente serán los que se usan para la transducción de AAV en general. Adicionalmente, se puede utilizar los títulos que se usan para transducir las células particulares en los ejemplos de la presente. Las células pueden incluir cualquier célula humana deseada, así como de otros mamíferos grandes (no roedores), tales como primates, caballo, ovejas, cabras, cerdos y perros.

[0039] Más específicamente, la presente divulgación provee un método para administrar un ácido nucleico en una célula ependimal, que comprende administrar en la célula ependimal una partícula de AAV2 que contiene un vector que comprende el ácido nucleico insertado entre un par de repeticiones terminales invertidas de AAV, para así proveer el ácido nucleico en la célula ependimal.

[0040] También se divulga un método para administrar un ácido nucleico a un sujeto que comprende administrar en una célula del sujeto una partícula de AAV2 que comprende el ácido nucleico insertado entre un par de repeticiones terminales invertidas de AAV, y volver a introducir la célula en el sujeto, para de esa manera proveer el ácido nucleico al sujeto. Los ITR AAV pueden ser ITR de AAV2. Para dicha administración *ex vivo*, se aíslan células de un sujeto utilizando los medios estándar de acuerdo con el tipo de célula y se colocan en un medio de cultivo apropiado, nuevamente de acuerdo con el tipo celular. Luego se recubren las partículas virales con las células como se describió antes, y se deja que el virus transfecte las células. Luego las células se pueden volver a transplantar en el cuerpo del sujeto, nuevamente con los medios estándar para el tipo de célula y de tejido. Si se deseara deseado, antes del trasplante, se pueden estudiar las células por su grado de transfección por el virus, mediante medios de detección conocidos y como se describe en la presente.

[0041] Además se divulga un método para administrar un ácido nucleico en una célula de un sujeto que comprende administrar al sujeto una partícula de AAV2 que comprende el ácido nucleico insertado entre un par de repeticiones terminales invertidas de AAV, para de esa manera proveer el ácido nucleico en una célula en el sujeto. La administración puede ser una administración *ex vivo* directamente en una célula retirada de un sujeto, tal como cualquiera de las células enumeradas antes, seguido por introducción nuevamente de la célula en el sujeto, o la administración puede ser una administración *in vivo* en una célula en el sujeto. Para una administración *ex vivo*, se aíslan células de un sujeto utilizando los medios estándar de acuerdo con el tipo de célula y se colocan en un medio de cultivo apropiado, nuevamente de acuerdo con el tipo celular. Luego se recubren las partículas virales con las células como se describió antes, y se deja que el virus transfecte las células. Luego las células se pueden volver a transplantar en el cuerpo del sujeto, nuevamente con los medios estándar para el tipo de célula y de tejido. Si se deseara deseado, antes del trasplante, se pueden estudiar las células por su grado de transfección por el virus, mediante medios de detección conocidos y como se describe en la presente.

[0042] También se divulga un método para administrar un ácido nucleico en una célula ependimal de un sujeto que comprende administrar al sujeto una partícula de AAV2 que comprende el ácido nucleico insertado entre un par de repeticiones terminales invertidas de AAV, para de esa manera proveer el ácido nucleico en una célula ependimal en el sujeto.

[0043] En determinados aspectos, la secuencia de aminoácidos dirigida al endotelio vascular del cerebro es direccionada al endotelio vascular del cerebro de un sujeto que padece una enfermedad, por ejemplo, una enfermedad por almacenamiento lisosómico.

[0044] En determinados aspectos, la secuencia de aminoácidos dirigida al endotelio vascular del cerebro es direccionada al endotelio vascular del cerebro de un sujeto que no padece una enfermedad por almacenamiento lisosómico.

[0045] En determinados aspectos, el vector viral comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un agente terapéutico. En determinadas formas de realización, el agente terapéutico es TPP1.

[0046] Determinados aspectos de la presente divulgación proveen una célula que comprende un vector viral descrito en la presente.

[0047] En determinados aspectos, la célula es una célula de mamífero de un mamífero no roedor. En determinadas formas de realización, la célula es una célula de primate. En determinadas formas de realización, la célula es una célula humana. En determinados aspectos, la célula es una célula no humana. En determinados aspectos, la célula se encuentra *in vitro*. En determinadas formas de realización, la célula se encuentra *in vivo*. En determinados aspectos, la célula es una célula ependimal.

[0048] Determinados aspectos de la presente divulgación proveen un método de tratamiento de una enfermedad en un mamífero que comprende administrar un vector viral o la célula, como se describe en la presente, al mamífero.

[0049] En determinados aspectos, el mamífero es un humano.

[0050] En determinados aspectos, la enfermedad es una enfermedad por almacenamiento lisosómico (LSD). En determinados aspectos, la LSD es una lipofuscinosis ceroides infantil o infantil tardía, Gaucher, Batten juvenil, Fabry, MLD, Sanfilippo A, Batten infantil tardío, Hunter, Krabbe, Morquio, Pompe, Niemann-Pick C, Tay-Sachs, Hurler (MPS-I H), Sanfilippo B, Maroteaux-Lamy, Niemann-Pick A, cistinosis, Hurler-Scheie (MPS-I H/S), síndrome de Sly (MPS VII), Scheie (MPS-I S), Batten infantil, gangliosidosis GM1, mucopolisacaridosis tipo II/III o enfermedad de Sandhoff.

[0051] En determinados aspectos, la enfermedad es una enfermedad neurodegenerativa. En determinadas formas de realización, la enfermedad neurodegenerativa es la enfermedad de Huntington, ALS, hemiplegia espástica hereditaria, esclerosis lateral primaria, atrofia muscular espinal, enfermedad de Kennedy, mal de Alzheimer, una enfermedad por repeticiones de poliglutamina o el mal de Parkinson.

[0052] Determinados aspectos de la presente divulgación proveen un método para suministrar un agente en el sistema nervioso central de un sujeto, que comprende administrar en el CSF un vector viral descrito en la presente de manera que las células ependimales transducidas expresen el agente terapéutico y suministren dicho agente en el sistema nervioso central del sujeto. En determinadas formas de realización, el vector viral transduce células ependimales.

[0053] Determinados aspectos de la presente divulgación proveen un vector viral o una célula, descritos en la presente, para usar en tratamientos médicos.

[0054] Determinados aspectos de la presente divulgación proveen el uso de un vector viral o una célula, descritos en la presente, para preparar un medicamento de utilidad para tratar una enfermedad, por ejemplo, una enfermedad por almacenamiento lisosómico, en un mamífero.

[0055] El vector puede comprender además una enzima lisosómica (por ejemplo, una hidrolasa lisosómica), una proteína secretada, una proteína nuclear o una proteína citoplasmática. Según se usa en la presente, el término "proteína secretada" incluye cualquier proteína secretada, ya sea secretada naturalmente o modificada para contener una secuencia señal para que pueda ser secretada.

[0056] Un ácido nucleico está ligado operativamente cuando se encuentra en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. En general, el término "ligado operativamente" significa que las secuencias de ADN que están siendo ligadas sean contiguas. Sin embargo, no es necesario que los potenciadores sean contiguos. La unión se logra mediante enlaces de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, se usan adaptadores o conectores de oligonucleótidos sintéticos de acuerdo con la práctica convencional. Adicionalmente, se pueden unir múltiples copias del ácido nucleico que codifica las enzimas en el vector de expresión. Dichos ácidos nucleicos múltiples pueden estar separados por conectores.

[0057] La presente divulgación también provee una célula de mamífero que contiene un vector descrito en la presente. La célula puede ser humana y puede ser de cerebro. El tipo de célula puede comprender una población de células madre o progenitoras.

[0058] La presente divulgación provee un método de tratamiento de una enfermedad, tal como una enfermedad genética o un cáncer en un mamífero, mediante la administración de un polinucleótido, polipéptido, vector de expresión o célula, descritos en la presente. La enfermedad genética o el cáncer puede ser una enfermedad por almacenamiento lisosómico (LSD), tal como una lipofuscinosis ceroides infantil o infantil tardía, Gaucher, Batten juvenil, Fabry, MLD, Sanfilippo A, Batten infantil tardío, Hunter, Krabbe, Morquio, Pompe, Niemann-Pick C, Tay-Sachs, Hurler (MPS-I H), Sanfilippo B, Maroteaux-Lamy, Niemann-Pick A, cistinosis, Hurler-Scheie (MPS-I H/S), síndrome de Sly (MPS VII), Scheie (MPS-I S), Batten infantil, gangliosidosis GM1, mucopolisacaridosis tipo II/III o la enfermedad de Sandhoff.

[0059] La enfermedad genética puede ser una enfermedad neurodegenerativa, tal como la enfermedad de Huntington, ALS, hemiplegia espástica hereditaria, esclerosis lateral primaria, atrofia muscular espinal, enfermedad de Kennedy, mal de Alzheimer, una enfermedad por repeticiones de poliglutamina o exposición focal tal como el mal de Parkinson.

[0060] Determinados aspectos de la divulgación se relacionan con polinucleótidos, polipéptidos, vectores y células modificadas genéticamente (modificadas *in vivo*), y el uso de los mismos. En particular, la divulgación se relaciona con un método para una terapia génica o con proteínas que permita una administración sistémica de una dosis terapéuticamente eficaz del agente terapéutico.

[0061] De acuerdo con un aspecto, se provee un sistema de expresión celular para expresar un agente terapéutico en un receptor de mamífero. El sistema de expresión (también denominado "célula modificada genéticamente" en la presente) comprende una célula y un vector de expresión para expresar el agente terapéutico. Los vectores de

expresión incluyen, pero en un sentido no taxativo, virus, plásmidos y otros vehículos para suministrar un material genético heterólogo a células. Por lo tanto, el término "vector de expresión", según se usa en la presente, se refiere a un vehículo para suministrar un material genético heterólogo en una célula. En particular, el vector de expresión es una vector adenoviral, de un virus adeno-asociado o de un lentivirus o de un retrovirus recombinante.

5 [0062] El vector de expresión incluye además un promotor para controlar la transcripción del gen heterólogo. El promotor puede ser un promotor inducible (descrito más adelante). El sistema de expresión es adecuado para su administración al receptor de mamífero. El sistema de expresión puede comprender una pluralidad de células modificadas genéticamente no inmortalizadas, donde cada célula contiene por lo menos un gen recombinante que codifica por lo menos un agente terapéutico.

15 [0063] El sistema de expresión celular se puede formar *in vivo*. De acuerdo con aún otro aspecto, se provee un método para tratar a un receptor de mamífero *in vivo*. El método incluye introducir a un vector de expresión para expresar un producto génico heterólogo en una célula del paciente *in situ*, tal como mediante una administración intravenosa. Para formar el sistema de expresión *in vivo*, se introduce un vector de expresión para expresar el agente terapéutico *in vivo* en el receptor de mamífero por vía i.v., donde el vector migra a través de la vasculatura al cerebro.

20 [0064] De acuerdo con aún otro aspecto, se provee un método para tratar a un receptor de mamífero *in vivo*. El método incluye introducir la proteína blanco en el paciente *in vivo*.

[0065] El vector de expresión para expresar el gen heterólogo puede incluir un promotor inducible para controlar la transcripción del producto génico heterólogo. Por lo tanto, la administración del agente terapéutico *in situ* está controlada por la exposición de la célula *in situ* a condiciones que inducen la transcripción del gen heterólogo.

25 [0066] El receptor de mamífero puede padecer una condición que es susceptible a una terapia de reemplazo genético. Según se usa en la presente, una "terapia de reemplazo genético" se refiere a la administración al receptor del material genético exógeno que codifica un agente terapéutico y la subsiguiente expresión del material genético administrado *in situ*. Por consiguiente, la frase "condición susceptible a una terapia de reemplazo genético" abarca condiciones tales como enfermedades genéticas (es decir, una condición de enfermedad que sea atribuible a uno o más defectos genéticos), patologías adquiridas (es decir, una condición patológica que no es atribuible a un defecto congénito), cánceres y procesos profilácticos (es decir, prevención de una enfermedad o de una condición médica indeseada). Por lo tanto, según se usa en la presente, el término "agente terapéutico" se refiere a cualquier agente o material, que tiene un efecto beneficioso sobre el receptor de mamífero. Por consiguiente, un "agente terapéutico" abarca moléculas tanto terapéuticas como profilácticas que comprende componentes de ácidos nucleicos o de proteínas.

40 [0067] De acuerdo con un aspecto, el receptor de mamífero tiene una enfermedad genética y el material genético exógeno comprende un gen heterólogo que codifica un agente terapéutico para tratar la enfermedad. En aún otro aspecto el receptor de mamífero tiene una patología adquirida y el material genético exógeno comprende un gen heterólogo que codifica un agente terapéutico para tratar dicha patología. De acuerdo con otro aspecto, el paciente tiene un cáncer y el material genético exógeno comprende un gen heterólogo que codifica un agente antineoplásico. En aún otro aspecto, el paciente padece una condición médica indeseada y el material genético exógeno comprende un gen heterólogo que codifica un agente terapéutico para tratar dicha condición.

45 [0068] Según se usa en la presente, el término "enzima lisosómica", una "proteína secretada", una "proteína nuclear" o una "proteína citoplasmática" incluyen variantes o fragmentos biológicamente activos o inactivos de estos polipéptidos. Una "variante" de uno de los polipéptidos es un polipéptido que no es completamente idéntico a una proteína nativa. Dicha variante de proteína se puede obtener mediante alteración de la secuencia de aminoácidos por inserción, supresión o sustitución de uno o más aminoácidos. La secuencia de aminoácidos de la proteína se modifica, por ejemplo, mediante sustitución, para crear un polipéptido que tenga sustancialmente las mismas cualidades, o mejoradas, en comparación con el polipéptido nativo. La sustitución puede ser una sustitución conservada. Una "sustitución conservada" es una sustitución de un aminoácido por otro aminoácido que tenga una cadena lateral similar. Una sustitución conservada sería una sustitución por un aminoácido que provoque el menor cambio posible en la carga del aminoácido o en el tamaño de la cadena lateral del aminoácido (como alternativa, del tamaño, carga o tipo de grupo químico en la cadena lateral) de manera tal que el péptido en general retenga su conformación espacial, pero tenga una actividad biológica alterada. Por ejemplo, los cambios conservados comunes podrían ser Asp por Glu, Asn o Gln; His por Lys, Arg o Phe; Asn por Gln, Asp o Glu y Ser por Cys, Thr o Gly. Habitualmente se usa alanina para la sustitución por otros aminoácidos. Los 20 aminoácidos esenciales se pueden agrupar de la siguiente manera: alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, triptofano y metionina que tienen cadenas laterales no polares; glicina, serina, treonina, cistina, tirosina, asparagina y glutamina que tienen cadenas laterales polares sin carga; aspartato y glutamato que tienen cadenas laterales ácidas; y lisina, arginina e histidina que tienen cadenas laterales básicas.

65 [0069] Los cambios de aminoácidos se logran cambiando los codones de la secuencia de ácidos nucleicos correspondiente. Se sabe que dichos polipéptidos se pueden obtener basado en la sustitución de determinados

aminoácidos por otros aminoácidos en la estructura polipeptídica con el fin de modificar o mejorar la actividad biológica. Por ejemplo, la sustitución de aminoácidos alternativos permite conferir pequeños cambios conformacionales a un polipéptido, lo cual resultará en una mayor actividad. Como alternativa, las sustituciones de aminoácidos de determinados polipéptidos se pueden usar para proveer residuos, que luego se pueden unir a otras moléculas para proveer conjugados de péptido-molécula que retenga suficientes propiedades del polipéptido de partida como para que sean útiles para otros fines.

[0070] Se puede usar el índice hidropático de aminoácidos para conferir una función biológica interactiva a un polipéptido, en donde se encontró que determinados aminoácidos pueden ser sustituidos por otros aminoácidos con índices hidropáticos similares y aún retener una actividad biológica similar. Como alternativa, la sustitución de aminoácidos similares se puede efectuar basado en la hidrofiliidad, en particular cuando la función biológica deseada del polipéptido a generar será para usar en formas de realización inmunológicas. La mayor hidrofiliidad promedio local de una "proteína", gobernada por la hidrofiliidad de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con su inmunogenicidad. Por lo tanto, las sustituciones se pueden efectuar sobre la base de la hidrofiliidad asignada a cada aminoácido.

[0071] Cuando se usa ya sea el índice de hidrofiliidad o el índice hidropático, que asigna valores a cada aminoácido, se prefiere realizar sustituciones de aminoácidos donde estos valores sean de ± 2 , siendo particularmente preferido ± 1 y siendo aquellos con $\pm 0,5$ las sustituciones más preferidas.

[0072] La variante de proteína tiene por lo menos 50%, por lo menos aproximadamente 80% o aún por lo menos aproximadamente 90% pero menos de un 100%, de homología o identidad de secuencias de aminoácidos contiguas con la secuencia de aminoácidos de una proteína nativa correspondiente.

[0073] La secuencia de aminoácidos de la variante de polipéptido corresponde esencialmente a la secuencia de aminoácidos del polipéptido nativo. Según se usa en la presente, "corresponde esencialmente a" se refiere a una secuencia de polipéptidos que generará una respuesta biológica que es sustancialmente la misma que la respuesta generada por la proteína nativa. Dicha respuesta puede comprender por lo menos un 60% del nivel generado por la proteína nativa, y aún puede comprender por lo menos un 80% del nivel generado por la proteína nativa.

[0074] Una variante puede incluir residuos de aminoácidos que no están presentes en la correspondiente proteína nativa, o puede incluir supresiones relativas a la correspondiente proteína nativa. Una variante también puede ser un "fragmento" que está truncado en comparación con la correspondiente proteína nativa, es decir, solamente una porción de una proteína de longitud completa. Las variantes de proteínas también incluyen péptidos que contengan por lo menos un D-aminoácido.

[0075] La variante de proteína se puede expresar a partir de una secuencia de ADN aislada que codifica la variante de proteína. El término "recombinante" se define como un péptido o ácido nucleico producido mediante procesos de ingeniería genética. Cabe notar que es bien conocido en el arte que, debido a la redundancia del código genético, se pueden intercambiar fácilmente nucleótidos individuales en un codón y aún obtener como resultado una secuencia de aminoácidos idéntica. Los términos "proteína" "péptido" y "polipéptido" se usan indistintamente en la presente.

[0076] La presente divulgación provee métodos de tratamiento de una enfermedad en un mamífero que comprenden administrar un vector de expresión a una célula o paciente. Para los métodos de terapia génica, un especialista en el arte de la biología molecular y las terapias génicas podrá determinar, sin una experimentación excesiva, las dosificaciones y rutas de administración apropiadas del vector de expresión usado en los nuevos métodos de la presente divulgación.

[0077] De acuerdo con un aspecto, las células se transforman o se modifican de otra manera *in vivo*. Las células del receptor de mamífero se transforman (es decir, se transducen o transfectan) *in vivo* con un vector que contiene un material genético exógeno para expresar un gen heterólogo (por ejemplo, recombinante) que codifica un agente terapéutico y el agente terapéutico se provee *in situ*.

[0078] Según se usa en la presente, "material genético exógeno" se refiere a un ácido nucleico o un oligonucleótido, ya sea natural o sintético, que no se encuentra naturalmente en las células; o si es natural en las células, no es transcrito o expresado a niveles biológicamente significativos por las células. Por consiguiente, un "material genético exógeno" incluye, por ejemplo, un ácido nucleico no natural que se puede transcribir en ARN antisentido, así como un "gen heterólogo" (es decir, un gen que codifica una proteína que no se expresa o se expresa a niveles biológicamente insignificantes en una célula natural del mismo tipo).

[0079] En determinados aspectos, el receptor de mamífero padece una condición que es susceptible a una terapia de reemplazo genético. Según se usa en la presente, una "terapia de reemplazo genético" se refiere a la administración al receptor del material genético exógeno que codifica un agente terapéutico y la subsiguiente expresión del material genético administrado *in situ*. Por consiguiente, la frase "condición susceptible a una terapia de reemplazo genético" abarca condiciones tales como enfermedades genéticas (es decir, una condición de

enfermedad que sea atribuible a uno o más defectos genéticos), patologías adquiridas (es decir, una condición patológica que no es atribuible a un defecto congénito), cánceres y procesos profilácticos (es decir, prevención de una enfermedad o de una condición médica indeseada). Por lo tanto, según se usa en la presente, el término "agente terapéutico" se refiere a cualquier agente o material, que tiene un efecto beneficioso sobre el receptor de mamífero. Por consiguiente, un "agente terapéutico" abarca moléculas terapéuticas, así como profilácticas que comprenden dicho ácido nucleico (por ejemplo, ARN antisentido) y/o componentes proteicos.

[0080] Como alternativa, la condición susceptible a una terapia de reemplazo genético es un proceso profiláctico, es decir, un proceso para prevenir una enfermedad o una condición médica indeseada. Por consiguiente, la presente divulgación abarca un sistema de expresión celular para administrar un agente terapéutico que cumple una función profiláctica (es decir, un agente profiláctico) al receptor de mamífero.

[0081] En resumen, el término "agente terapéutico" incluye, pero en un sentido no taxativo, los agentes asociados con las condiciones enumeradas precedentemente, así como sus equivalentes funcionales. Según se usa en la presente, el término "equivalente funcional" se refiere a una molécula (por ejemplo, un péptido o una proteína) que tiene el mismo efecto beneficioso, o mejorado, sobre el receptor de mamífero que el agente terapéutico del cual es considerado como un equivalente funcional.

[0082] Los agentes terapéuticos y condiciones susceptibles a una terapia de reemplazo genético divulgados antes son meramente ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la presente divulgación. La selección de un agente terapéutico adecuado para tratar una condición conocida se considera dentro del alcance de un especialista del arte sin una experimentación excesiva.

Vectores de AAV2

[0083] En una forma de realización, un vector viral de la divulgación es un vector AAV2. Un vector "AAV2" se refiere a un virus adeno-asociado y se puede referir al propio virus de tipo salvaje natural o a derivados del mismo. El término abarca todos los subtipos, serotipos y pseudotipos, y formas tanto naturales como recombinantes, excepto cuando se requiera lo contrario. Según se usa en la presente, el término "serotipo" se refiere a un AAV que se identifica y distingue de otros AAV basado en la reactividad de la proteína de la cápside con antisueros definidos; por ejemplo, hay ocho serotipos conocidos de los AAV de primate, los AAV-1 a AAV-8. Por ejemplo, el serotipo AAV2 se usa para hacer referencia a un AAV que contiene proteínas de la cápside codificados por el gen cap del AAV2 y un genoma que contiene secuencias ITR 5' y 3' del mismo serotipo de AAV2. Según se usa en la presente, por ejemplo, se puede usar AAVr1 para hacer referencia a un AAV que comprende proteínas de la cápside e ITR 5'-3' del mismo serotipo o se puede referir a un AAV que comprende proteínas de la cápside de un serotipo e ITR 5'-3' de un serotipo de AAV diferente, por ejemplo, de la cápside del serotipo 2 del AAV y las ITR del serotipo 5 del AAV. Por cada ejemplo ilustrado en la presente la descripción del diseño y la producción del vector describe el serotipo de la cápside y las secuencias ITR 5'-3'. La abreviatura "AAVr" se refiere a un virus adeno-asociado recombinante, también conocido como vector de AAV recombinante (o "vector AAVr").

[0084] Un "virus AAV" o una "partícula viral AAV" se refiere a una partícula viral compuesta por al menos una proteína de la cápside del AAV (preferiblemente por todas las proteínas de la cápside de un AAV de tipo salvaje) y un polinucleótido encapsulado. Si la partícula comprende un polinucleótido heterólogo (es decir, un polinucleótido distinto de un genoma de AAV de tipo salvaje, tal como un transgen, que será administrado a una célula de mamífero), típicamente se denomina "AAVr".

[0085] En una forma de realización, los vectores de expresión AAV se construyen usando técnicas conocidas para al menos comprender, como componentes ligados operativamente en la dirección de la transcripción, elementos de control que incluyen una región de inicio de la transcripción, el ADN de interés y una región de terminación de la transcripción. Los elementos de control se seleccionarán para que sean funcionales en una célula de mamífero. La construcción resultante que contiene a los componentes ligados operativamente está flanqueada (5' y 3') por secuencias ITR AAV funcionales.

[0086] Las "repeticiones terminales invertidas del virus adeno-asociado" o "ITR AAV" son las regiones conocidas en el arte que se encuentran en cada extremo del genoma del AAV que funcionan juntos en cis como orígenes de la replicación de ADN y como señales de empaquetamiento para el virus. Las ITR AAV, junto con la región codificante rep AAV, proveen un corte y rescate eficientes y la integración de una secuencia de nucleótidos interpuesta entre dos ITR flanqueadoras en el genoma de una célula de mamífero.

[0087] Las secuencias de nucleótidos de las regiones ITR AAV son conocidas. Según se usa en la presente, no es necesario que una "ITR AAV" comprenda la secuencia de nucleótidos de tipo salvaje representada, sino que puede estar alterada, por ejemplo, mediante la inserción, supresión o sustitución de nucleótidos. Adicionalmente, la ITR AAV puede derivar de cualquiera de diversos serotipos de AAV que incluyen, en un sentido no taxativo, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV7, etc. Además, las ITR 5' y 3' que flanquean una secuencia de nucleótidos seleccionada en un vector AAV no necesariamente son idénticos ni derivan del mismo serotipo o forma aislada de AAV, siempre que funcionen según lo previsto, es decir, que permitan el corte y rescate de la secuencia de interés

del genoma o vector de una célula huésped, y que permitan la integración de la secuencia heteróloga en el genoma de la célula receptora cuando los productos del gen Rep AAV están presentes en la célula.

[0088] En una forma de realización, las ITR AAV pueden derivar de cualquiera de diversos serotipos del AAV, que incluyen en un sentido no taxativo, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV7, etc. Además, las ITR 5' y 3' que flanquean una secuencia de nucleótidos seleccionada en un vector de expresión AAV no necesariamente son idénticos ni derivan del mismo serotipo o forma aislada de AAV, siempre que funcionen según lo previsto, es decir, que permitan el corte y rescate de la secuencia de interés del genoma o vector de una célula huésped, y que permitan la integración de la molécula de ADN en el genoma de la célula receptora cuando los productos del gen Rep AAV están presentes en la célula.

[0089] En una forma de realización, las cápsides del AAV pueden derivar de AAV2. El tamaño de las moléculas de ADN adecuadas para usar en los vectores de AAV serán de menos que aproximadamente 5 kilobases (kb), menos que aproximadamente 4,5 kb, menos que aproximadamente 4 kb, menos que aproximadamente 3,5 kb, menos que aproximadamente 3 kb, menos que aproximadamente 2.5 kb y son conocidas en el arte.

[0090] En una forma de realización, la secuencia de nucleótidos seleccionada está ligada operativamente a elementos de control que dirigen la transcripción o expresión de la misma en el sujeto *in vivo*. Dichos elementos de control pueden comprender las secuencias de control que normalmente están asociadas con el gen seleccionado. Como alternativa, se pueden emplear secuencias de control heterólogas. Las secuencias de control heterólogas que son de utilidad en general incluyen aquellas que derivan de secuencias que codifican genes de mamífero o virales. Los ejemplos incluyen, pero en un sentido no taxativo, el promotor SV40 temprano, el promotor LTR del virus de tumor mamario de ratón; el promotor tardío mayor de adenovirus (Ad MLP); un promotor del virus Herpes simplex (HSV), un promotor de citomegalovirus (CMV) tal como la región del promotor temprano inmediato del CMV (CMVIE), un promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV), promotores pol II, promotores pol III, promotores sintéticos, promotores híbridos y semejantes. Además, las secuencias derivadas de genes no virales, tal como el gen de la metalotioneína murina, también son de utilidad en la presente. Dichas secuencias promotoras se encuentran disponibles comercialmente, por ejemplo, de Stratagene (San Diego, California).

[0091] En una forma de realización, tanto los promotores heterólogos como otros elementos de control, tales como promotores específicos del SNC e inducibles, potenciadores y semejantes, serán de particular utilidad. Los ejemplos de promotores heterólogos incluyen el promotor del CMV. Los ejemplos de promotores específicos del SNC incluyen aquellos que se aíslan de los genes de la proteína básica de mielina (MBP), la proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP) y la enolasa específica de neuronas (NSE). Los ejemplos de promotores inducibles incluyen elementos sensibles a ADN para ecdisona, tetraciclina, hipoxia y aúfina.

[0092] En una forma de realización, el vector de expresión AAV que contiene a la molécula de ADN de interés unida por las ITR AAV, se puede construir mediante inserción directa de una o más secuencias seleccionadas en un genoma de AAV de la cual se han recortado los principales marcos de lectura abiertos ("ORF") del AAV. También se pueden suprimir otras porciones del genoma de AAV, siempre que permanezca una porción suficiente de las ITR para que puedan realizar las funciones de replicación y empaquetamiento. Dichas construcciones se pueden diseñar usando técnicas bien conocidas en el arte.

[0093] Como alternativa, las ITR AAV se pueden recortar del genoma viral o de un vector de AAV que contenga al mismo y luego se pueden fusionar en 5' y 3' de una construcción de ácidos nucleicos seleccionada que está presente en otro vector usando técnicas de ligación estándar. Por ejemplo, las ligaciones se pueden llevar a cabo en Tris-Cl 20 mM pH 7,5, MgCl₂ 10 mM, DTT 10 mM, BSA 33 µg/ml, NaCl 10 mM-50 mM y ya sea ATP 40 uM, 0,01-0,02 unidades (Weiss) de T4 ADN ligasa a 0 °C (para una ligación de "extremos adhesivos") o bien, ATP 1 mM, 0,3-0,6 unidades (Weiss) de T4 ADN ligasa a 14 °C (para una ligación de "extremos romos"). Las ligaciones intermoleculares de "extremos adhesivos" habitualmente se efectúan a concentraciones de 30-100 µg/ml de ADN total (concentración total final de 5-100 nM). Vectores de AAV que contienen ITR.

[0094] Adicionalmente, se pueden producir genes quiméricos mediante síntesis para que incluyan secuencias de ITR AAV dispuestas 5' y 3' de una o más secuencias de ácidos nucleicos seleccionadas. Se pueden usar codones preferidos para la expresión de la secuencia del gen quimérico en células del SNC de mamífero. La secuencia quimérica completa se ensambla a partir de oligonucleótidos superpuestos preparados mediante métodos estándar.

[0095] Con el fin de producir viriones de AAVr, se introduce un vector de expresión AAV en una célula huésped adecuada usando técnicas conocidas, tal como mediante transfección. Hay numerosas técnicas de transfección que son conocidas en general en el arte. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., (1989) *Molecular Cloning, a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, Nueva York. Los métodos de transfección particularmente adecuados incluyen coprecipitación por fosfato de calcio, microinyección directa en las células cultivadas, electroporación, transferencia de genes mediada por liposomas, transducción mediada por lípidos y provisión de ácidos nucleicos usando microproyectiles a gran velocidad.

[0096] En una forma de realización, las células huésped adecuadas para producir viriones de AAVr incluyen

microorganismos, células de levadura, células de insecto y células de mamífero, que se pueden usar o que se han usado como receptores de una molécula de ADN heteróloga. El término incluye la progenie de la célula original que fue transfectada. Por consiguiente, una "célula huésped", según se usa en la presente, en general se refiere a una célula que ha sido transfectada con una secuencia de ADN exógena. Se pueden usar células de la línea celular humana estable, 293 (disponible, por ejemplo, de *American Type Culture Collection* con el N° de Acceso ATCC CRL1573) en la práctica de la presente divulgación. En particular, la línea celular humana 293 es una línea celular de riñón embrionario humano que fue transformada con fragmentos de ADN del adenovirus tipo 5 y expresa los genes adenovirales E1a y E1b. La línea celular 293 se puede transfectar fácilmente, y provee una plataforma particularmente conveniente en para producir los viriones de AAVr.

[0097] Una "región codificante de rep AAV" se refiere a la región reconocida en el arte del genoma de AAV que codifica las proteínas replicación Rep 78, Rep 68, Rep 52 y Rep 40. Se ha demostrado que estos productos de expresión de Rep tienen muchas funciones, que incluyen reconocimiento, unión y *nicking* o corte del origen de replicación del ADN de AAV, actividad ADN helicasa y modulación de la transcripción a partir de promotores del AAV (u otros promotores heterólogos). Los productos de la expresión de Rep son necesarios en su conjunto para la replicación del genoma del AAV. Los homólogos adecuados de la región codificante de rep AAV incluyen el gen rep del herpesvirus humano 6 (HHV-6) que también se sabe que interviene en la replicación del ADN de AAV-2.

[0098] Una "región codificante de cap del AAV" se refiere a la región reconocida en el arte del genoma de AAV que codifica las proteínas de la cápside VP1, VP2 y VP3, u homólogos funcionales de las mismas. Estos productos de expresión de cap proveen las funciones de empaquetamiento que en su conjunto se requieren para empaquetar el genoma viral.

[0099] En una forma de realización, se introducen funciones ayudantes de AAV en la célula huésped mediante transfección de la célula huésped con una construcción ayudante del AAV ya sea antes o de manera concurrente con la transfección del vector de expresión AAV. Las construcciones de ayudantes del AAV se usan entonces para proveer por lo menos una expresión transitoria de los genes rep y/o cap del AAV para complementar las funciones que le faltan al AAV y que son necesarias para una infección productiva del AAV. Las construcciones ayudantes del AAV carecen de las ITR AAV y tampoco pueden replicarse o empaquetarse a sí mismos. Estas construcciones se pueden encontrar en la forma de un plásmido, fago, transposón, cósmido, virus o virión. Se han descrito numerosas construcciones de ayudantes del AAV, tales como los plásmidos de uso común, pAAV/Ad y pIM29+45, que codifican los productos de expresión de ambos Rep y Cap. Se han descrito numerosos vectores adicionales que codifican los productos de expresión de Rep y/o Cap.

[0100] Los métodos de administración de los vectores virales incluyen inyectar el AAV2 en el CSF. En general, los viriones AAVr se pueden introducir en las células del SNC usando técnicas de transducción ya sea *in vivo* o *in vitro*. Si la transducción es *in vitro*, la célula receptora deseada será retirada del sujeto, transducida con los viriones AAVr e introducida nuevamente en el sujeto. Como alternativa, se pueden usar células singénicas o xenogénicas porque dichas células no generarán una respuesta inmunológica inapropiada en el sujeto.

[0101] Se han descrito métodos adecuados para la administración e introducción de las células transducidas en un sujeto. Por ejemplo, las células se pueden transducir *in vitro* mediante combinación de los viriones de AAV recombinantes con células del SNC, por ejemplo, en un medio apropiado, y luego se pueden seleccionar aquellas células que contienen al ADN de interés usando técnicas convencionales, tales como transferencias Southern y/o PCR, o usando marcadores seleccionables. Las células transducidas se pueden formular luego en composiciones farmacéuticas, descritas con mayor detalle más adelante, y la composición se puede introducir en el sujeto mediante diversas técnicas, tal como mediante injertos, inyección intramuscular, intravenosa, subcutánea e intraperitoneal.

[0102] En una forma de realización, las composiciones farmacéuticas comprenderán material genético suficiente como para producir una cantidad terapéuticamente eficaz del ácido nucleico de interés, es decir, una cantidad suficiente como para reducir o aliviar los síntomas del estado de enfermedad en cuestión o una cantidad suficiente para conferir el beneficio deseado. Las composiciones farmacéuticas también van a contener un excipiente farmacéuticamente aceptable. Dichos excipientes incluyen cualquier agente farmacéutico que por sí mismo no inducirá la producción de anticuerpos perjudiciales para el individuo que recibe la composición, y que se pueden administrar sin ocasionar una toxicidad indebida. Los excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero en un sentido no taxativo, sorbitol, Tween80 y líquidos tales como agua, salina, glicerol y etanol. Se pueden incluir sales farmacéuticamente aceptables en las mismas, por ejemplo, sales de ácidos minerales tales como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos, sulfatos y semejantes; y las sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos y semejantes. Adicionalmente, también puede haber sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias amortiguadoras del pH y semejantes en dichos vehículos. Se puede consultar una descripción exhaustiva de los excipientes farmacéuticamente aceptables en *Remington's Pharmaceutical Sciences* (Mack Pub. Co., N.J. 1991).

[0103] Será evidente para los especialistas en el arte, en vista de las divulgaciones de esta descripción, que la cantidad eficaz del vector viral que se debe agregar puede determinarse empíricamente. La administración se puede efectuar en una sola dosis, de manera continua o intermitente durante el transcurso del tratamiento. Los métodos

para determinar la manera y las dosis de administración más efectivas son bien conocidos por los especialistas en el arte y variarán según el vector viral, la composición de la terapia, las células blanco y el sujeto bajo tratamiento. Se pueden llevar a cabo administraciones simples y múltiples con el nivel de dosis y el patrón elegido por el médico tratante.

[0104] Se comprenderá que el vector viral administrado podría expresar más de un transgen. Como alternativa, también se pueden administrar vectores separados, donde cada uno expresa uno o más transgenes diferentes, en el SNC como se describe en la presente. Además, también se prevé que los vectores virales administrados mediante los métodos de la presente divulgación se puedan combinar con otras composiciones y terapias adecuadas.

Métodos para introducir material genético en células

[0105] El material genético exógeno (por ejemplo, un ADNc que codifica una o más proteínas terapéuticas) se introduce en la célula *ex vivo* o *in vivo* mediante métodos de transferencia genética, tales como transfección o transducción, para proveer una célula modificada genéticamente. Los diversos vectores de expresión (es decir, los vehículos para facilitar la administración de un material genético exógeno en una célula blanco) son conocidos por un especialista en el arte.

[0106] Según se usa en la presente, la "transfección de células" se refiere a la adquisición por una célula de un material genético nuevo mediante incorporación del ADN agregado. Por consiguiente, la transfección se refiere a la inserción de un ácido nucleico en una célula usando métodos físicos o químicos. Los especialistas en el arte conocen diversas técnicas de transfección que incluyen: coprecipitación de ADN por fosfato de calcio; DEAE-dextrano; electroporación; transfección mediada por liposomas catiónicas; y bombardeo de micropartículas facilitado por partículas de tungsteno. La coprecipitación ADN por fosfato de estroncio es otro método de transfección posible.

[0107] Por el contrario, la "transducción de células" se refiere al proceso de transferir un ácido nucleico a una célula usando un virus a ADN o ARN. Un virus a ARN (es decir, un retrovirus) para transferir un ácido nucleico a una célula se denomina retrovirus quimérico transductor en la presente. El material genético exógeno contenido en el retrovirus se incorpora en el genoma de la célula transducida. Una célula que ha sido transducida con un virus a ADN quimérico (por ejemplo, un adenovirus que comprende un ADNc que codifica un agente terapéutico), no habrá incorporado el material genético exógeno en su genoma, pero podrá expresar dicho material genético exógeno que está retenido extracromosómicamente en la célula.

[0108] Típicamente, el material genético exógeno incluye al gen heterólogo (habitualmente en la forma de un ADNc que comprende los exones que codifican la proteína terapéutica) junto con un promotor para controlar la transcripción del nuevo gen. El promotor tiene característicamente una secuencia de nucleótidos específica necesaria para iniciar la transcripción. Opcionalmente, el material genético exógeno incluye además las secuencias adicionales (es decir, potenciadores) necesarias para obtener la actividad de transcripción del gen deseado. A los efectos de esta descripción, un "potenciador" es simplemente cualquier secuencia de ADN no traducida que funciona en posición contigua con la secuencia codificante (en *cis*) para cambiar el nivel de transcripción basal dictado por el promotor. El material genético exógeno se puede introducir en el genoma de la célula inmediatamente 3' con respecto al promotor de manera tal que el promotor y la secuencia codificante estarán ligados operativamente para así permitir la transcripción de la secuencia codificante. Un vector de expresión retroviral puede incluir un elemento promotor exógeno para controlar la transcripción del gen exógeno insertado. Dichos promotores exógenos incluyen promotores tanto constitutivos como inducibles.

[0109] Los promotores constitutivos naturales controlan la expresión de las funciones celulares esenciales. Como resultado de ello, un gen bajo el control de un promotor constitutivo se expresará bajo todas las condiciones del crecimiento celular. Los ejemplos de promotores constitutivos incluyen los promotores de los siguientes genes que codifican determinadas funciones constitutivas o de "mantenimiento": hipoxantina fosforibosilo transferasa (HPRT), dihidrofolato reductasa (DHFR), adenosina desaminasa, fosfoglicerol quinasa (PGK), piruvato quinasa, fosfoglicerol mutasa, el promotor de actina y otros promotores constitutivos conocidos por los especialistas en el arte. Además, hay muchos promotores virales que funcionan de manera constitutiva en células eucariotas. Estos promotores incluyen: los promotores de SV40 temprano y tardío; las repeticiones terminales largas (LTR) del virus de la leucemia de Moloney y otros retrovirus; y el promotor de la timidina quinasa del virus Herpes Simplex, entre muchos otros. Por lo tanto, se puede usar cualquiera de los promotores constitutivos mencionados precedentemente para controlar la transcripción de un inserto de un gen heterólogo.

[0110] Los genes que se encuentran bajo el control de promotores inducible se expresan solamente o en mayor grado, en la presencia de un agente inductor, (por ejemplo, la transcripción bajo el control del promotor de metalotioneína está muy aumentada en la presencia de determinados iones de metales). Los promotores inducibles incluyen elementos sensibles (RE) que estimulan la transcripción cuando sus factores inductores están unidos. Por ejemplo, hay RE para los factores séricos, hormonas esteroides, ácido retinoico y AMP cíclico. Se pueden seleccionar promotores que contienen un RE particular con el fin de obtener una respuesta inducible y, en algunos casos, el propio RE puede estar unido a un promotor diferente, y de esa manera conferir inducibilidad al gen recombinante. Por consiguiente, con la selección del promotor apropiado (constitutivo versus inducible; fuerte versus

débil), es posible controlar tanto la existencia como el nivel de expresión de un agente terapéutico en la célula modificada genéticamente. Si el gene que codifica el agente terapéutico se encuentra bajo el control de un promotor inducible, la administración del agente terapéutico *in situ* es desencadenada por la exposición de la célula modificada genéticamente *in situ* a condiciones que permitirán la transcripción del agente terapéutico, por ejemplo, mediante inyección intraperitoneal de inductores específicos de los promotores inducibles que controlan la transcripción del agente. Por ejemplo, la expresión *in situ* por las células modificadas genéticamente de un agente terapéutico codificado por un gen que se encuentra bajo el control del promotor de metalotioneína, mejora con el contacto de las células modificadas genéticamente con una solución que contiene los iones de metal apropiados (es decir, inductores) *in situ*.

[0111] Por lo tanto, la cantidad de agente terapéutico que será administrada *in situ* está regulada por el control de factores tales como: (1) la naturaleza del promotor usado para dirigir la transcripción del gen insertado, (es decir, si el promotor es constitutivo o inducible, fuerte o débil); (2) la cantidad de copias del gen exógeno que se inserta en la célula; (3) la cantidad de células transducidas/transfectadas administradas (por ejemplo, implantadas) en el paciente; (4) el tamaño del implante (por ejemplo, un injerto o un sistema de expresión encapsulado); (5) la cantidad de implantes; (6) la extensión de tiempo que se dejarán las células o los implantes transducidos/transfectados en el lugar; y (7) el índice de producción del agente terapéutico por la célula modificada genéticamente. Se considera que la selección y optimización de estos factores para la administración de una dosis terapéuticamente eficaz de un agente terapéutico particular son propias del alcance de un especialista en el arte sin una experimentación excesiva, teniendo en cuenta los factores divulgados precedentemente y el perfil clínico del paciente.

[0112] Además de por lo menos un promotor y por lo menos un ácido nucleico heterólogo que codifica el agente terapéutico, el vector de expresión puede incluir un gen de selección, por ejemplo, un gen de resistencia a neomicina, para facilitar la selección de células que fueron transfectadas o transducidas con el vector de expresión. Como alternativa, las células se transfectan con dos o más vectores de expresión, donde por lo menos uno de los vectores contiene uno o más genes codificantes de uno o más agentes terapéuticos, y el otro vector contiene un gen de selección. La selección de un promotor, potenciador, gen de selección y/o secuencia señal (descritos más adelante) adecuados se considera dentro del alcance de un especialista del arte sin una experimentación excesiva.

[0113] El agente terapéutico puede ser direccionado para su administración en una ubicación extracelular, intracelular o de membrana. Si fuera deseable secretar el producto génico de las células, el vector de expresión se diseñará para que incluya una secuencia de "señal" de secreción apropiada para secretar el producto génico terapéutico de la célula hacia el medio extracelular. Si fuera deseable retener el producto génico en la célula, se omitirá esta secuencia de señal de secreción. De manera similar, el vector de expresión se puede construir de manera tal que incluya secuencias de señal de "retención" para anclar el agente terapéutico dentro de la membrana plasmática. Por ejemplo, todas las proteínas de membrana tienen regiones transmembrana hidrofóbicas, que detienen la translocación de la proteína en la membrana y no permiten la secreción de la proteína. La construcción de un vector de expresión que incluya secuencias de señal para direccionar un producto génico hacia una ubicación particular se considera dentro del alcance de un especialista en el arte sin necesidad de una experimentación excesiva.

Ejemplo 1: Tratamiento de trastornos del sistema nervioso central a través del líquido cefalorraquídeo (CSF) en mamíferos grandes

[0114] Los trastornos por almacenamiento lisosómico (LSD) constituyen una amplia clase de trastornos metabólicos heredados. La mayoría de los LSD son causados por deficiencias de enzimas lisosómicas que conducen a daños de órganos y a menudo degeneración del sistema nervioso central (SNC). La lipofuscinosis ceroide neuronal infantil tardía (LINCL) es una enfermedad neurodegenerativa recesiva autosómica causada por mutaciones en *CLN2*, que codifica la proteasa tripeptidilo peptidasa 1 (TPP1) lisosómica. La LINCL se caracteriza clínicamente por un deterioro motor y cognitivo progresivo, y muerte prematura. Actualmente hay una terapia de reemplazo enzimático (ERT) disponible para las enfermedades por almacenamiento lisosómico que afectan a los tejidos periféricos, pero no se ha utilizado en pacientes con compromiso del sistema nervioso central (SNC). En un estudio reciente se investigó si la administración de la enzima por el líquido cefalorraquídeo podría ser una ruta alternativa potencial al SNC para la LINCL (Chang et al., *Molecular Therapy* 16: 649-656, 2008). En este estudio, los investigadores evaluaron si era eficaz una administración intraventricular de TPP1 en el ratón con LINCL. Encontraron que la infusión de la TPP1 humana recombinante mediante una cánula intraventricular condujo a una distribución de la enzima en varias regiones del cerebro de los ratones. Los ensayos de actividad *in vitro* confirmaron una mayor actividad de TPP1 en toda la extensión rostral-caudal del cerebro. Los ratones tratados mostraron una neuropatología atenuada y un temblor en reposo reducido con relación a los ratones tratados con vehículo.

[0115] El paso siguiente fue determinar si era posible alcanzar los niveles en estado estable, a largo plazo, de las enzimas terapéuticas en un mamífero. Se descubrió que las células ependimales (células que revisten los ventrículos del cerebro) se pueden transducir y luego secretan la enzima deseada hacia el líquido cefalorraquídeo (CSF). Se determinó que el virus adeno-asociado (AAV4) puede transducir el epéndimo en un modelo de ratón con gran eficiencia. Davidson et al, *PNAS*, 28: 3428-3432, 2000. Se encontró que en los ratones había una normalización de los niveles de sustrato almacenado en el cerebro enfermo después del tratamiento con AAV4.

[0116] En el presente trabajo, se investigó si se podía emplear una administración global de un vector con el fin de alcanzar niveles en estado estable de la enzima en el CSF. Primero, fue necesario encontrar un vector que pudiera transducir las células endocelulares (células que revisten los ventrículos) en el cerebro de mamíferos más grandes. Se condujeron estudios en un modelo con perros de LINCL y en un modelo en primates no humanos de LINCL. Los perros con LINCL son normales al nacer, pero desarrollaron signos neurológicos aproximadamente a los 7 meses, déficits cognitivos comprobables a los ~ 5-6 meses, convulsiones a los 10-11 meses y una pérdida visual progresiva. Se seleccionó un virus adeno-asociado (AAV) como vector debido a su pequeño tamaño (20 nm), porque la mayor parte de su material genético puede ser retirado ("vaciado") de modo tal que no habrá genes virales y por ende su replicación se vuelve incompetente. Se había evaluado previamente si los vectores del virus adeno-asociado tipo 4 (AAV4) podía intervenir en mejoras funcionales y patológicas globales en un modelo de murino de mucopolisacaridosis tipo VII (MPS VII) causado por una deficiencia de la beta-glucuronidasa (Liu et al., *J. Neuroscience*, 25(41): 9321-9327, 2005). Los vectores de AAV4 recombinantes que codifican beta-glucuronidasa se inyectaron unilateralmente en el ventrículo lateral de ratones MPS VII con la enfermedad establecida. El epéndimo transducido expresó niveles altos de la enzima recombinante, donde la enzima secretada penetró en las estructuras cerebrales y cerebelosas, así como en el tallo cerebral. Los estudios inmunohistoquímicos revelaron una asociación estrecha entre la enzima recombinante y la microvasculatura cerebral, lo cual indica que la beta-glucuronidasa alcanzó al parénquima cerebral por los vasos sanguíneos del revestimiento de los espacios perivasculares. El aprendizaje asociativo aversivo se evaluó mediante un condicionamiento de miedo al contexto. En comparación con los controles heterocigotas de edad correspondiente, los ratones afectados mostraron una respuesta al miedo condicionado deteriorado y discriminación del contexto. Este déficit conductual se revertió a las 6 semanas después de la transferencia de genes en ratones MPS VII tratados con AAV4 beta-glucuronidasa. Los datos muestran que las células endocelulares pueden servir como una fuente de secreción enzimática hacia el parénquima y CSF circundante del cerebro.

[0117] Sin embargo, cuando estos estudios se extendieron a mamíferos grandes (es decir, perros y primates no humanos), sorprendentemente los vectores de AAV4 no eran eficaces en el direccionamiento hacia el epéndimo en estos animales. En su lugar, fue necesario utilizar un vector AAV2. Se muestran los resultados de estos experimentos para perros (Figura 1) y primates no humanos (NHP, Figura 2). Brevemente, se generó un AAVr2 que codifica TPP1 (AAV2-CLN2) y se inyectó por vía intraventricular para transducir el epéndimo (Liu et al., *J. Neuroscience*, 25(41): 9321-9327, 2005). TPP1 es la enzima deficiente en la LINCL. Los datos indicaron que la transducción endocelular en el cerebro NHP dio como resultado un aumento significativo de la enzima en el CSF (Figura 3). Los resultados indicaron niveles elevados de actividad de TPP1 en varias regiones del cerebro, donde en el eje vertical se muestra el % de control de actividad (Figura 4).

[0118] En el primer perro tratado, la administración del vector fue subóptima, pero aún mostró actividad de CLN2 en el cerebro. Los perros subsiguientes fueron sometidos a administración ICV con estereotaxia. Se encontró que las habilidades cognitivas de los perros tratados mejoraron significativamente con respecto a un perro no tratado, medido por el desempeño en el laberinto en T (Figura 5). Además, los efectos de la administración ICV de AAV2-CLN2 en el modelo de LINCL en perros eran muy pronunciados. En el animal no tratado (-/-), hay ventrículos grandes, en tanto los cerebros de los animales control no tratados y de los animales tratados no se observaron ventrículos. Después de la administración de AAV.TPP1 en los ventrículos de los perros LINCL, se observó actividad enzimática detectable en varias regiones del cerebro, incluyendo el cerebelo y la médula espinal superior. En otros dos perros afectados vivos, la atrofia del cerebro era atenuada significativamente, aumentó la longevidad y mejoró la función cognitiva. Finalmente, en NHP, se mostró que este método permite alcanzar niveles de actividad TPP1 que se encuentran 2-5 veces por encima del tipo salvaje.

[0119] Se generaron varios vectores AAV y se evaluaron para determinar la combinación óptima de ITR y cápside. Se produjeron cinco combinaciones diferentes, una vez que se determinó que el AAV2 ITR era el más eficaz: AAV2/1 (es decir, AAV2 ITR y AAV1 cápside), AAV2/2, AAV2/4, AAV2/5 y AAV2/8. Se descubrió que el AAV2/2 funcionó mucho mejor en los mamíferos grandes (perros y NHP), seguido por los vectores AAV2/8, AAV2/5, AAV2/1 y AAV2/4. Esto fue bastante sorprendente porque el orden de efectividad de los vectores virales es opuesto a lo observado en ratones.

[0120] Por consiguiente, en el trabajo presente se ha mostrado que las células del revestimiento ventricular pueden ser una fuente de la enzima recombinante en el CSF para su distribución en todo el cerebro, y que el AAV2/2 es un vehículo eficaz para la administración de agentes terapéuticos, tal como el gen que codifica CLN2 (TPP1) en perros y primates no humanos.

[0121] El uso de los términos "un" y "una" y "el", "la", "los" y "las" y de referentes similares en el contexto de descripción de la invención se deben interpretar para cubrir tanto el singular como el plural, a menos que se indique de otra manera en la presente o se encuentre claramente contraindicado por el contexto. Los términos "comprende", "tiene", "incluye" y "contiene" no se deben interpretar como términos indefinidos (es decir, significa "incluye, pero no se limita a") salvo que se indique de otra manera. La indicación de los rangos de valores en la presente sirve meramente como un método abreviado de hacer referencia individualmente a cada valor separado que cae dentro del rango, a menos que se indique de otra manera en la presente, y cada valor separado se incorpora en la

5 Descripción como si estuviera indicado individualmente en la presente. Todos los métodos que se describen en la presente se pueden realizar en cualquier orden apropiado a menos que se indique lo contrario en la presente o bien que el contexto lo contraindique claramente. El uso de cualquiera y todos ejemplos, o del lenguaje ejemplificativo (por ejemplo, "tal como") provistos en la presente, pretende ofrecer una mejor descripción de la invención. Ninguna expresión en la memoria descriptiva se debe interpretar como que indique que algún elemento no reivindicado sea esencial para la práctica de la invención.

10 [0122] En la presente se describen las formas de realización de esta invención, inclusive las mejores prácticas conocidas por los inventores para llevar a cabo la misma. Las variaciones de estas formas de realización serán evidentes para los especialistas en el arte con la lectura de la descripción precedente.

LISTADO DE SECUENCIAS

15 [0123]

- 15 <110> UNIVERSITY OF IOWA RESEARCH FOUNDATION
- <120> MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA TRATAR ENFERMEDADES DEL CEREBRO
- 20 <130> 17023.117wo1
- <140> PCT/US2012/031896
- <141> 2012-04-02
- 25 <150> 61/470.460
- <151> 2011-03-31
- <160> 4
- 30 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 735
- <212> PRT
- 35 <213> Virus adeno-asociado 2
- <400> 1

ES 2 745 470 T3

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Thr Leu Ser
 1 5 10 15

Glu Gly Ile Arg Gln Trp Trp Lys Leu Lys Pro Gly Pro Pro Pro Pro
 20 25 30

Lys Pro Ala Glu Arg His Lys Asp Asp Ser Arg Gly Leu Val Leu Pro
 35 40 45

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
 50 55 60

Val Asn Glu Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
 65 70 75 80

Arg Gln Leu Asp Ser Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala
 85 90 95

Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
 100 105 110

Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro
 115 120 125

Leu Gly Leu Val Glu Glu Pro Val Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
 130 135 140

Pro Val Glu His Ser Pro Val Glu Pro Asp Ser Ser Ser Gly Thr Gly
 145 150 155 160

Lys Ala Gly Gln Gln Pro Ala Arg Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
 165 170 175

ES 2 745 470 T3

Gly Asp Ala Asp Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Gln Pro Pro
180 185 190

Ala Ala Pro Ser Gly Leu Gly Thr Asn Thr Met Ala Thr Gly Ser Gly
195 200 205

Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Asn Ser
210 215 220

Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Met Gly Asp Arg Val Ile
225 230 235 240

Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu
245 250 255

Tyr Lys Gln Ile Ser Ser Gln Ser Gly Ala Ser Asn Asp Asn His Tyr
260 265 270

Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg Phe His
275 280 285

Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn Asn Trp
290 295 300

Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile Gln Val
305 310 315 320

Lys Glu Val Thr Gln Asn Asp Gly Thr Thr Thr Ile Ala Asn Asn Leu
325 330 335

Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr
340 345 350

Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro Ala Asp
355 360 365

Val Phe Met Val Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly Ser
370 375 380

Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe Pro Ser
385 390 395 400

Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Thr Phe Ser Tyr Thr Phe Glu
405 410 415

Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp Arg
420 425 430

Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser Arg Thr
435 440 445

ES 2 745 470 T3

Asn Thr Pro Ser Gly Thr Thr Thr Gln Ser Arg Leu Gln Phe Ser Gln
 450 455 460
 Ala Gly Ala Ser Asp Ile Arg Asp Gln Ser Arg Asn Trp Leu Pro Gly
 465 470 475 480
 Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys Thr Ser Ala Asp Asn Asn
 485 490 495
 Asn Ser Glu Tyr Ser Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His Leu Asn Gly
 500 505 510
 Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys Asp
 515 520 525
 Asp Glu Glu Lys Phe Phe Pro Gln Ser Gly Val Leu Ile Phe Gly Lys
 530 535 540
 Gln Gly Ser Glu Lys Thr Asn Val Asp Ile Glu Lys Val Met Ile Thr
 545 550 555 560
 Asp Glu Glu Glu Ile Arg Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Gln Tyr
 565 570 575
 Gly Ser Val Ser Thr Asn Leu Gln Arg Gly Asn Arg Gln Ala Ala Thr
 580 585 590
 Ala Asp Val Asn Thr Gln Gly Val Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asp
 595 600 605
 Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr
 610 615 620
 Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys
 625 630 635 640
 His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala Asn
 645 650 655
 Pro Ser Thr Thr Phe Ser Ala Ala Lys Phe Ala Ser Phe Ile Thr Gln
 660 665 670
 Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln Lys
 675 680 685
 Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn Tyr
 690 695 700
 Asn Lys Ser Val Asn Val Asp Phe Thr Val Asp Thr Asn Gly Val Tyr

ES 2 745 470 T3

705

710

715

720

Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu
725 730 735

<210> 2

<211> 734

<212> PRT

5 <213> Virus adeno-asociado 4

<400> 2

ES 2 745 470 T3

Met Thr Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser Glu
1 5 10 15

Gly Val Arg Glu Trp Trp Ala Leu Gln Pro Gly Ala Pro Lys Pro Lys
20 25 30

Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Ala Arg Gly Leu Val Leu Pro Gly
35 40 45

Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro Val
50 55 60

Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp Gln
65 70 75 80

Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala Asp
85 90 95

Ala Glu Phe Gln Gln Arg Leu Gln Gly Asp Thr Ser Phe Gly Gly Asn
100 105 110

Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro Leu
115 120 125

Gly Leu Val Glu Gln Ala Gly Glu Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg Pro
130 135 140

Leu Ile Glu Ser Pro Gln Gln Pro Asp Ser Ser Thr Gly Ile Gly Lys
145 150 155 160

Lys Gly Lys Gln Pro Ala Lys Lys Lys Leu Val Phe Glu Asp Glu Thr
165 170 175

Gly Ala Gly Asp Gly Pro Pro Glu Gly Ser Thr Ser Gly Ala Met Ser
180 185 190

Asp Asp Ser Glu Met Arg Ala Ala Ala Gly Gly Ala Ala Val Glu Gly
195 200 205

Gly Gln Gly Ala Asp Gly Val Gly Asn Ala Ser Gly Asp Trp His Cys
210 215 220

ES 2 745 470 T3

Asp Ser Thr Trp Ser Glu Gly His Val Thr Thr Thr Ser Thr Arg Thr
 225 230 235 240
 Trp Val Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu Tyr Lys Arg Leu Gly Glu
 245 250 255
 Ser Leu Gln Ser Asn Thr Tyr Asn Gly Phe Ser Thr Pro Trp Gly Tyr
 260 265 270
 Phe Asp Phe Asn Arg Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln
 275 280 285
 Arg Leu Ile Asn Asn Asn Trp Gly Met Arg Pro Lys Ala Met Arg Val
 290 295 300
 Lys Ile Phe Asn Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Thr Ser Asn Gly Glu
 305 310 315 320
 Thr Thr Val Ala Asn Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Ile Phe Ala Asp
 325 330 335
 Ser Ser Tyr Glu Leu Pro Tyr Val Met Asp Ala Gly Gln Glu Gly Ser
 340 345 350
 Leu Pro Pro Phe Pro Asn Asp Val Phe Met Val Pro Gln Tyr Gly Tyr
 355 360
 Cys Gly Leu Val Thr Gly Asn Thr Ser Gln Gln Gln Thr Asp Arg Asn
 370 375 380
 Ala Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly
 385 390 395 400
 Asn Asn Phe Glu Ile Thr Tyr Ser Phe Glu Lys Val Pro Phe His Ser
 405 410 415
 Met Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile
 420 425 430
 Asp Gln Tyr Leu Trp Gly Leu Gln Ser Thr Thr Thr Gly Thr Thr Leu
 435 440 445
 Asn Ala Gly Thr Ala Thr Thr Asn Phe Thr Lys Leu Arg Pro Thr Asn
 450 455 460
 Phe Ser Asn Phe Lys Lys Asn Trp Leu Pro Gly Pro Ser Ile Lys Gln
 465 470 475 480
 Gln Gly Phe Ser Lys Thr Ala Asn Gln Asn Tyr Lys Ile Pro Ala Thr

ES 2 745 470 T3

				485						490										495	
Gly	Ser	Asp	Ser	Leu	Ile	Lys	Tyr	Glu	Thr	His	Ser	Thr	Leu	Asp	Gly						
			500					505					510								
Arg	Trp	Ser	Ala	Leu	Thr	Pro	Gly	Pro	Pro	Met	Ala	Thr	Ala	Gly	Pro						
		515					520					525									
Ala	Asp	Ser	Lys	Phe	Ser	Asn	Ser	Gln	Leu	Ile	Phe	Ala	Gly	Pro	Lys						
	530					535					540										
Gln	Asn	Gly	Asn	Thr	Ala	Thr	Val	Pro	Gly	Thr	Leu	Ile	Phe	Thr	Ser						
545					550					555					560						
Glu	Glu	Glu	Leu	Ala	Ala	Thr	Asn	Ala	Thr	Asp	Thr	Asp	Met	Trp	Gly						
				565					570					575							
Asn	Leu	Pro	Gly	Gly	Asp	Gln	Ser	Asn	Ser	Asn	Leu	Pro	Thr	Val	Asp						
			580					585					590								
Arg	Leu	Thr	Ala	Leu	Gly	Ala	Val	Pro	Gly	Met	Val	Trp	Gln	Asn	Arg						
		595					600					605									
Asp	Ile	Tyr	Tyr	Gln	Gly	Pro	Ile	Trp	Ala	Lys	Ile	Pro	His	Thr	Asp						
	610					615					620										
Gly	His	Phe	His	Pro	Ser	Pro	Leu	Ile	Gly	Gly	Phe	Gly	Leu	Lys	His						
625					630					635					640						
Pro	Pro	Pro	Gln	Ile	Phe	Ile	Lys	Asn	Thr	Pro	Val	Pro	Ala	Asn	Pro						
				645					650					655							
Ala	Thr	Thr	Phe	Ser	Ser	Thr	Pro	Val	Asn	Ser	Phe	Ile	Thr	Gln	Tyr						
			660					665					670								
Ser	Thr	Gly	Gln	Val	Ser	Val	Gln	Ile	Asp	Trp	Glu	Ile	Gln	Lys	Glu						
		675					680					685									
Arg	Ser	Lys	Arg	Trp	Asn	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Thr	Ser	Asn	Tyr	Gly						
	690					695					700										
Gln	Gln	Asn	Ser	Leu	Leu	Trp	Ala	Pro	Asp	Ala	Ala	Gly	Lys	Tyr	Thr						
705					710					715					720						
Glu	Pro	Arg	Ala	Ile	Gly	Thr	Arg	Tyr	Leu	Thr	His	His	Leu								
				725					730												

ES 2 745 470 T3

<210> 3
 <211> 2208
 <212> ADN
 <213> Virus adeno-asociado 2

5

<400> 3

atggctgccg atggttatct tccagattgg ctcgaggaca ctctctctga aggaataaga	60
cagtgggtgga agctcaaacc tggcccacca ccaccaaacg ccgcagagcg gcataaggac	120
gacagcaggg gtcttgtgct tcctgggtac aagtacctcg gacccttcaa cggactcgac	180
aagggagagc cggtaacga ggcagacgcc gcggccctcg agcacgacaa agcctacgac	240
cggcagctcg acagcggaga caaccctgac ctcaagtaca accacgccga cgcggagttt	300
caggagcgcc ttaaagaaga tacgtctttt gggggcaacc tcggacgagc agtcttccag	360
gcgaaaaaga ggttcttga acctctgggc ctggttgagg aacctgttaa gacggctccg	420
ggaaaaaaga ggccggtaga gcactctcct gtggagccag actcctctc ggaaccgga	480
aaggcgggcc agcagcctgc aagaaaaaga ttgaattttg gtcagactgg agacgcagac	540
tcagtacctg acccccagcc tctcggacag ccaccagcag cccctctgg tctgggaact	600
aatac gatgg ctacaggcag tggcgcacca atggcagaca ataacgaggg cgccgacgga	660
gtgggtaatt cctcgggaaa ttggcattgc gattccacat ggatgggcca cagagtcac	720
accaccagca cccgaacctg ggccctgccc acctacaaca accacctcta caaacaatt	780
tccagccaat caggagcctc gaacgacaat cactactttg gctacagcac cccttggggg	840
tattttgact tcaacagatt cactgcccac tttcaccac gtgactggca aagactcatc	900
aacaacaact ggggattccg acccaagaga ctcaacttca agctctttaa cattcaagtc	960
aaagaggtca cgagaatga cggtagcagc acgattgccataaaccttac cagcacgggt	1020
caggtgttta ctgactcggga gtaccagctc ccgtacgtcc tcggctcggc gcatcaagga	1080
tgctcccgc cgttcccagc agacgtcttc atgggtccac agtatggata cctcaccctg	1140
aacaacggga gtcaggcagt aggacgtctt tcattttact gcctggagta ctttcttct	1200
cagatgctgc gtaccgaaa caactttacc ttcagctaca cttttgagga cgttctttc	1260
cacagcagct acgtcacag ccagagtctg gaccgtctca tgaatcctct catcgaccag	1320
tacctgtatt acttgagcag aacaacact ccaagtggaa ccaccacgca gtcaaggctt	1380
cagttttctc aggccggagc gagtgacatt cgggaccagt ctaggaactg gcttctcggga	1440
ccctgttacc gccagcagcg agtatcaaag acatctgcgg ataacaaca cagtgaatac	1500
tcgtggactg gagctaccaa gtaccacctc aatggcagag actctctggt gaatccgggc	1560
ccggccatgg caagccaca ggacgatgaa gaaaagtttt ttctcagag cggggttctc	1620
atctttggga agcaaggctc agagaaaaca aatgtggaca ttgaaaagg catgattaca	1680
gacgaagagg aatcaggac aaccaatccc gtggctacgg agcagtatgg ttctgtatct	1740
accaacctcc agagaggcaa cagacaagca gctaccgagc atgtcaacac acaaggcgtt	1800
cttccaggca tggctctggca ggacagagat gtgtacctc aggggcccac ctgggcaaaag	1860
attccacaca cggacggaca ttttcacccc tctcccctca tgggtggatt cggacttaaa	1920
caccctctc cacagattct catcaagaac accccggtac ctgcgaatcc ttcgaccacc	1980

ES 2 745 470 T3

<210> 4
 <211> 2205
 <212> ADN
 <213> Virus adeno-asociado 4

5

<400> 4

atgactgacg gttaccttcc agattggcta gaggacaacc tctctgaagg cgttcgagag	60
tggtgggagc tgcaacctgg agccccataa cccaaggcaa atcaacaaca tcaggacaac	120
gctcggggtc ttgtgcttcc gggttacaaa tacctcggac ccggcaacgg actcgacaag	180
ggggaacccg tcaacgcagc ggacgcggca gccctcgagc acgacaaggc ctacgaccag	240
cagctcaagg ccggtgacaa cccctacctc aagtacaacc acgccgacgc ggagttccag	300
cagcggcttc agggcgacac atcgtttggg ggcaacctcg gcagagcagt cttccaggcc	360
aaaaagaggg ttcttgaacc tcttggtctg gttgagcaag cgggtgagac ggctcctgga	420
aagaagagac cgttgattga atccccccag cagcccgact cctccacggg tatcggcaaa	480
aaaggcaagc agccggctaa aaagaagctc gttttcgaag acgaaactgg agcaggcgac	540
ggaccccctg agggatcaac ttccggagcc atgtctgatg acagtgagat gcgtgcagca	600
gctggcggag ctgcagtcga gggcggacaa ggtgccgatg gagtgggtaa tgcctcgggt	660
gattggcatt gcgattccac ctggctctgag ggccacgtca cgaccaccag caccagaacc	720
tgggtcttgc ccacctaca caaccacctc tacaagcgac tcggagagag cctgcagtcc	780
aacacctaca acggattctc caccacctgg ggatactttg acttcaaccg cttccactgc	840
cacttctcac cacgtgactg gcagcgactc atcaacaaca actggggcat gcgacccaaa	900
gcatgacggg tcaaatctt caacatccag gtcaaggagg tcacgacgtc gaacggcgag	960
acaacggtgg ctaataacct taccagcacg gttcagatct ttgcggactc gtcgtacgaa	1020
ctgccgtacg tgatggatgc gggtaagag ggcagcctgc ctcttttcc caacgacgtc	1080
tttatggtgc cccagtacgg ctactgtgga ctggtgaccg gcaaaccttc gcagcaacag	1140
actgacagaa atgccttcta ctgcctggag tactttcctt cgcagatgct gcggactggc	1200
aacaactttg aaattacgta cagttttgag aagggtgcctt tccactcgat gtacgcgcac	1260
agccagagcc tggaccggct gatgaacct ctcatcgacc agtacctgtg gggactgcaa	1320
tcgaccacca ccggaaccac cctgaatgcc gggactgcca ccaccaactt taccaagctg	1380
cggcctacca acttttccaa ctttaaaaag aactggctgc ccgggccttc aatcaagcag	1440
cagggcttct caaagactgc caatcaaac tacaagatcc ctgccaccgg gtcagacagt	1500
ctcatcaaat acgagacgca cagcactctg gacggaagat ggagtgccct gacccccgga	1560

ES 2 745 470 T3

cctccaatgg ccacggctgg acctgctggac agcaagttca gcaacagcca gctcatcttt	1620
gcggggccta aacagaacgg caacacggcc accgtaccgg ggactctgat cttcacctct	1680
gaggaggagc tggcagccac caacgccacc gatacggaca tgtggggcaa cctacctggc	1740
ggtgaccaga gcaacagcaa cctgcccacc gtggacagac tgacagcctt gggagccgtg	1800
cctggaatgg tctggcaaaa cagagacatt tactaccagg gtcccatttg ggccaagatt	1860
cctcataccg atggacactt tcaccctca ccgctgattg gtgggtttgg gctgaaacac	1920
ccgcctctc aaatttttat caagaacacc ccggtacctg cgaatcctgc aacgacctc	1980
agctctactc cggtaaactc cttcattact cagtacagca ctggccagggt gtcggtgcag	2040
attgactggg agatccagaa ggagcgggcc aaacgctgga accccgagggt ccagtttacc	2100
tccaactacg gacagcaaaa ctctctgttg tgggctcccg atgctggctgg gaaatacact	2160
gagcctaggg ctatcgggtac ccgctacctc acccaccacc tgtaa	2205

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Una partícula de AAVr2 que comprende una proteína de la cápside de AAV2 y un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína terapéutica insertada entre un par de repeticiones terminales invertidas de AAV para usar en el tratamiento de una enfermedad por almacenamiento lisosómico (LSD) en un mamífero no roedor, en donde dicha partícula de AAVr2 se administrará al mamífero no roedor mediante inyección intraventricular o administración ICV, en donde la proteína es tripeptidilo peptidasa 1 (TPP1), en donde la LSD es una lipofuscinosis ceroide infantil tardía (LINCL) y en donde el mamífero no roedor es un perro, un primate o un humano.
- 10 **2.** La partícula de AAVr2 que comprende una proteína de la cápside de AAV2 y un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína terapéutica insertada entre un par de repeticiones terminales invertidas de AAV para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el mamífero no roedor es un primate o un perro.
- 15 **3.** La partícula de AAVr2 que comprende una proteína de la cápside de AAV2 y un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína terapéutica insertada entre un par de repeticiones terminales invertidas de AAV para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el mamífero no roedor es un humano.
- 20 **4.** La partícula de AAVr2 que comprende una proteína de la cápside de AAV2 y un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína terapéutica insertada entre un par de repeticiones terminales invertidas de AAV para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el par de repeticiones terminales invertidas de AAV es un par de repeticiones terminales invertidas de AAV2.

AAVeGFP en perros

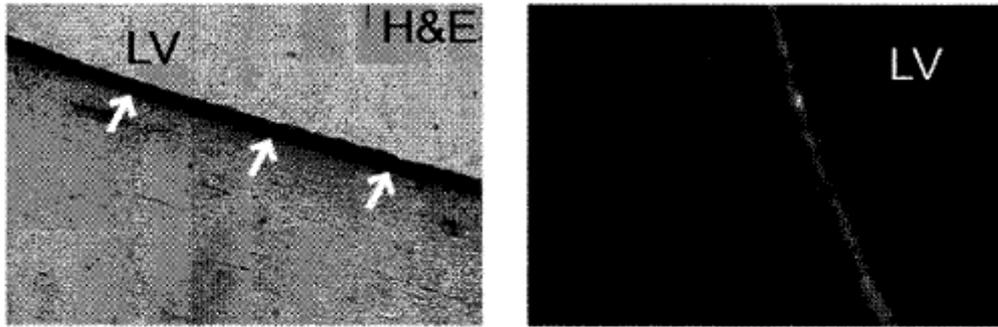


FIGURA 1

AAVeGFP en cerebro de primate no humano

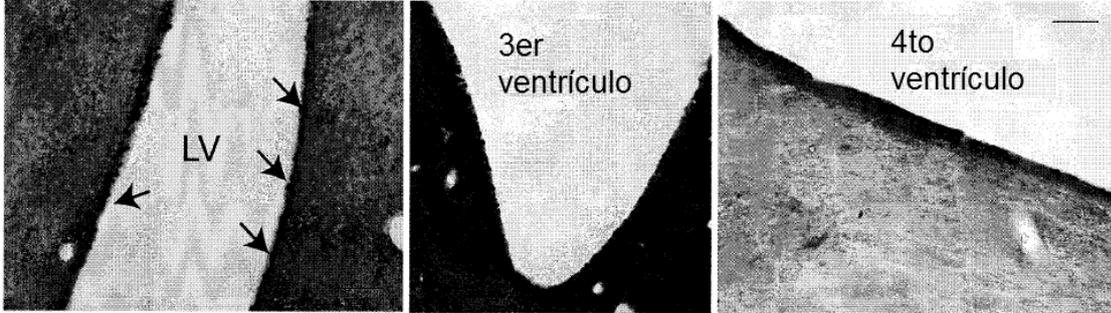


FIGURA 2

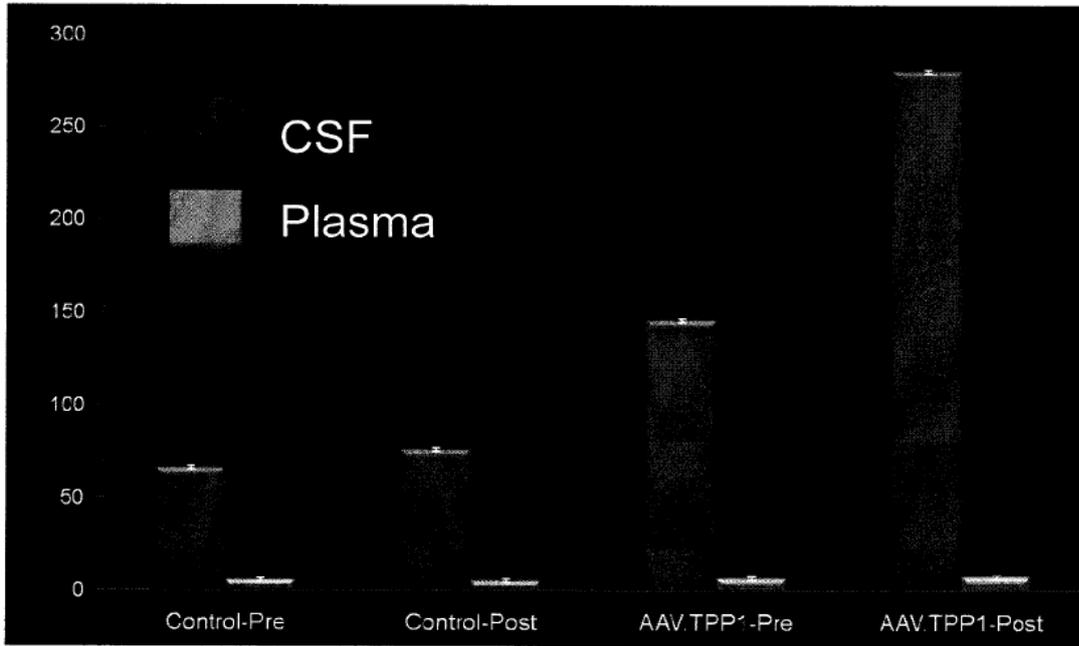


FIGURA 3

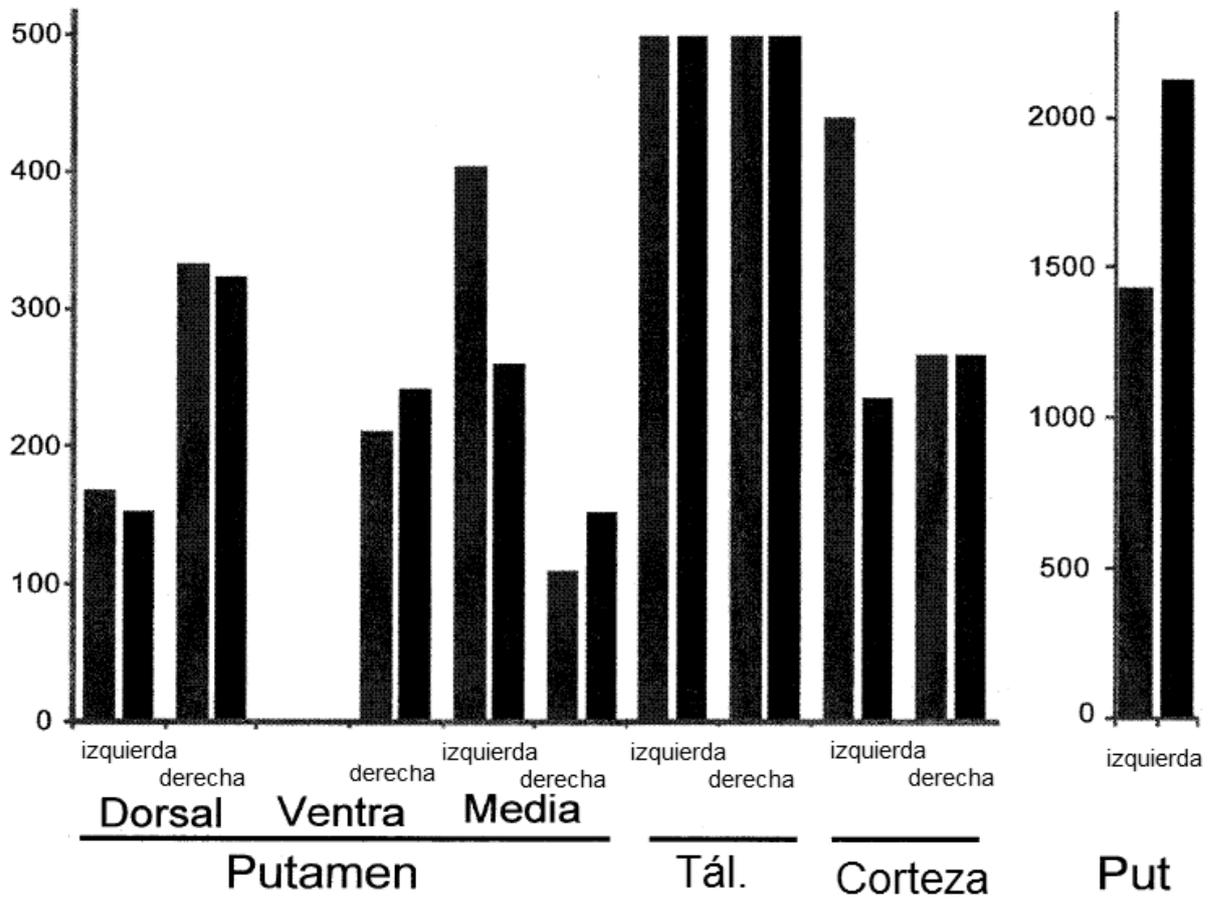


FIGURA 4

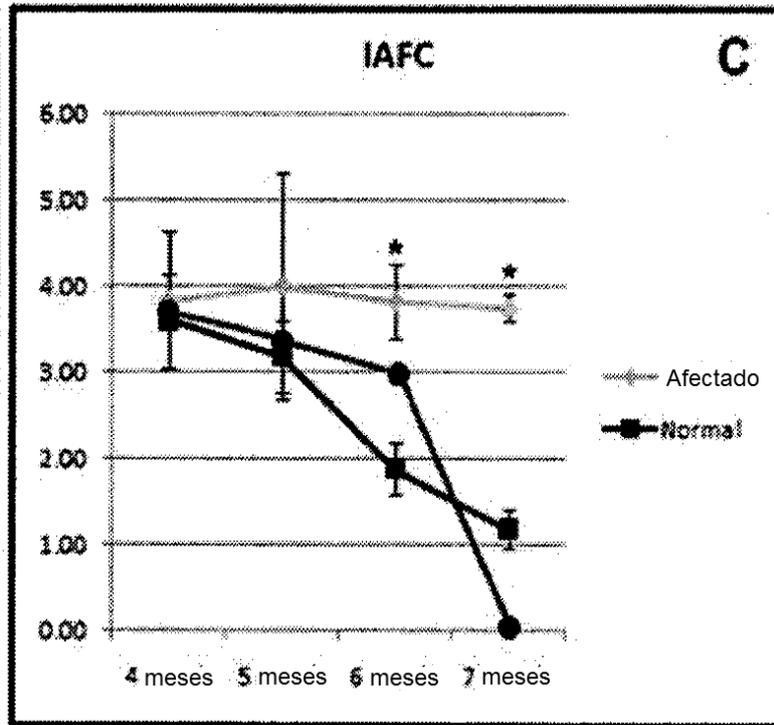


FIGURA 5

Alineamiento de múltiples secuencias ClustalW (v1.83)

2 secuencias alineadas Calificación de alineamiento = no
 Huecos insertados = 7 Identidades conservadas = 446

Modo de alineamiento apareado: lento

Parámetros de alineamiento apareado:

Penalidad por apertura de hueco = 10.0 Penalidad por extensión de hueco = 0.1

Matriz de similitud: gonnet

Parámetros de alineamiento múltiple:

Penalidad por apertura de hueco = 10.0 Penalidad por extensión de hueco = 0.1

Retraso de divergentes = 40%

Distancia de hueco = 8

Matriz de similitud: gonnet

Tiempo de procesamiento: 0.2 segundos

```

AAV4capPro 1 -MTDGYLPDWLEDNLSEGVREWWALQPGAPKPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLGPNGLD 59
AAV2capPro 1 MAADGYLPDWLEDTLSEGIQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPNGLD 60
      ***** . **** * ** * ** * ** . . * * ***** *****
      .

AAV4capPro 60 KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAQFQRLQGDTSFGGNLGRAVFQ 119
AAV2capPro 61 KGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSDGNPYLKYNHADAQFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ 120
      ***** ***** ***** ** ***** ***** ** ***** *****

AAV4capPro 120 AKKRVLEPLGLVEQAGETAPGKKRPLIESPQQPDSSTGIGKKGKQPAKKKLVFEDETGAG 179
AAV2capPro 121 AKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEPDSSTGKAGQQPARKRLNFGQTGDAD 180
    
```

FIGURA 6A-1


```

** . * . . * . * . . * *** . ** * * . . * . . .
AAV4capPro 591 VDRLTALGAVPGMVWQNRDIYYQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLIGGFGLKHPPPQIFIKNT 650
AAV2capPro 592 TADVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNT 651
      * . ***** ** * ***** ***** *****
...

AAV4capPro 651 PVPANPATTFSSTPVNSFITQYSTGQVSVQIDWEIQKERSKRWNPEVQFTSNYGQNSLL 710
AAV2capPro 652 PVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSEIEWELQKNSKRWNPEIQYTSNYNKSVD 711
      ***** **** ***** * ** *** ***** * ****
...

AAV4capPro 711 WAPDAAGKYTEPRAIGTRYLTHHL 734
AAV2capPro 712 FTVDTNVYSEPRPIGTRYLTRNL 735
      * * * *** ***** *
...

```

FIGURA 6A-3

Alineamiento de múltiples secuencias ClustalW (v1.83)

2 secuencias alineadas Calificación de alineamiento = no
 Huecos insertados = 10 Identities conservadas = 1440

Modo de alineamiento apareado: lento

Parámetros de alineamiento apareado:

 Penalidad por apertura de hueco = 10.0 Penalidad por extensión de hueco = 5.0

Parámetros de alineamiento múltiple:

 Penalidad por apertura de hueco = 30.0 Penalidad por extensión de hueco = 5.0
 Retraso de divergentes = 40% Transiciones: Ponderadas

Tiempo de procesamiento: 1.8 segundos

1. AAV2capNuc vs. AAV4capNuc1

Longitud alineada = 2235 Huecos = 10
 Identities = 1440 (65%)

```
AAV2capNuc   1 ATGGCTGCCGATGGTTATCTTCCAGATTGGCTCGAGGACACTCTCTCTGAAGGAATAAGA   60
AAV4capNuc1  1 ---ATGACTGACGGTTACCTTCCAGATTGGCTAGAGGACAACCTCTCTGAAGGCGTTCGA   57
              * ** ***** ***** ***** ***** * **

AAV2capNuc   61 CAGTGGTGGGAGCTCAAACCTGGCCACCACCACCAAGCCCGCAGAGCGGCATAAGGAC   120
AAV4capNuc1  58 GAGTGGTGGGCGCTGCAACCTGGAGCCCCTAAACCAAGGCAAATCAACAACATCAGGAC   117
              ***** ** ***** * ** *** ** * * * ** *****
```

FIGURA 6B-1

ES 2 745 470 T3

```

AAV2capNuc 121 GACAGCAGGGGTCTTGTGCTTCTGGGTACAAGTACCTCGGACCCTTCAACGGACTCGAC 180
AAV4capNuc1 118 AACGCTCGGGGTCTTGTGCTTCCGGTTACAAATACCTCGGACCCGGCAACGGACTCGAC 177
      ** ***** ** ***** ***** ***** *****
AAV2capNuc 181 AAGGAGAGCCGGTCAACGAGGCAGACGCCGGCCCTCGAGCAGACAAGCCTACGAC 240
AAV4capNuc1 178 AAGGGGAACCCGTCAACGCAGCGACGCCGAGCCCTCGAGCAGACAAGCCTACGAC 237
      ***** ** ***** ** ***** ***** ***** *****
AAV2capNuc 241 CGGCAGCTCGACAGCGGAGACAACCCGTACCTCAAGTACAACCACGCCGACGGGAGTTT 300
AAV4capNuc1 238 CAGCAGCTCAAGGCCGGTGACAACCCCTACCTCAAGTACAACCACGCCGACGGGAGTTC 297
      * ***** * ** ***** *****
AAV2capNuc 301 CAGGAGCGCCTTAAAGAAGATACGTCTTTTGGGGCAACCTCGGACGAGCAGTCTTCCAG 360
AAV4capNuc1 298 CAGCAGCGGCTTCAAGGCCGACACATCGTTTGGGGCAACCTCGGACGAGCAGTCTTCCAG 357
      *** ** * * * ** * * * ***** *****
AAV2capNuc 361 GCGAAAAAGAGGGTCTTGAACCTCTGGCCTGGTTGAGGAACCTGTTAAGACGGCTCCG 420
AAV4capNuc1 358 GCCAAAAAGAGGGTCTTGAACCTCTTGGTCTGGTTGAGCAAGCGGTGAGACGGCTCCT 417
      ** ***** ** ***** ** * * * *****
AAV2capNuc 421 GGAAAAAGAGGCCGGTAGAGCACTCTCCTGTGGAGCCAGACTCCTCCTCGGGAACCGGA 480
AAV4capNuc1 418 GGAAAGAAGAGACCGTTGATTGAATCCCCCAGCAGCCGACTCCTCACGGGTATCGGC 477
      ***** ***** ** * * * * * ***** ***** * * *
AAV2capNuc 481 AAGGCGGGCCAGCAGCCTGCAAGAAAAAGATTGAATTTTGGTCAGACTGGAGACGCAGAC 540
AAV4capNuc1 478 AAAAAAGGCAAGCAGCGGCTAAAAAGAAGCTCGTTTTCGA-----AGACGAAACT 528
      ** *** ***** ** * * * * * * * * * * * ***** *

```

FIGURA 6B-2

ES 2 745 470 T3

```

AAV2capNuc 961 AAAGAGGTCACGCAGAATGACGGTACGACGACGATTGCCAATAACCTTACCAGCACGGTT 1020
AAV4capNuc1 934 AAGGAGGTCACGACGTCGAACGGCGAGACAACGGTGGCTAATAACCTTACCAGCACGGTT 993
      ** ***** * **** ** ** * ** *****

AAV2capNuc 1021 CAGGTGTTTACTGACTCGGAGTACCAGCTCCCGTACGTCCTCGGCTCGGCCATCAAGGA 1080
AAV4capNuc1 994 CAGATCTTTGCGGACTCGTCGTACGAACTGCCGTACGTGATGGATGCGGGTCAAGAGGGC 1053
      *** * ** * ***** **** * ** ***** * * *** ** * **

AAV2capNuc 1081 TGCCTCCCGCCGTTCCAGCAGACGTCTTCATGGTGCCACAGTATGGATACCTCACCCCTG 1140
AAV4capNuc1 1054 AGCCTGCCTCCTTTTCCCAACGACGCTTTATGGTGCCCGAGTACGGCTACTGTGGACTG 1113
      *** ** * * * ** ***** ***** ***** ** *** **

AAV2capNuc 1141 AACCAACGGGAGT--CAGGCAGTAGGACGCTC-----TTCATTTTACTGCCTGGAGTAC 1191
AAV4capNuc1 1114 GTGACCGGCAACACTTCGCAGCAACAGACTGACAGAAATGCCTTCTACTGCCTGGAGTAC 1173
      * ** * **** * * ** * * ** *****

AAV2capNuc 1192 TTTCTTCTCAGATGCTGCGTACCGGAAACAACCTTTACCTTCAGCTACACTTTTGAGGAC 1251
AAV4capNuc1 1174 TTTCTTTCGAGATGCTGCGGACTGGCAACAACCTTTGAAATTACGTACAGTTTTGAGAAG 1233
      ***** ***** ** ** ***** * * **** ***** *

AAV2capNuc 1252 GTTCCTTTCACAGCAGCTACGCTCACAGCCAGAGTCTGGACCGTCTCATGAATCCTCTC 1311
AAV4capNuc1 1234 GTGCCTTTCACACTCGATGTACGCGCACAGCCAGAGCCTGGACCGGTGATGAACCCTCTC 1293
      ** ***** * ***** ***** ***** ** ***** *****

AAV2capNuc 1312 ATCGACCAGTACCTGTATTACTTGAGCAGAACAACACTCCAAGTGAACCACCACGCAG 1371
AAV4capNuc1 1294 ATCGACCAGTACCTGTGGGACTGCAATCGACCACCACCGAACCACCCTGAATGCCGGG 1353
      ***** ***** ** ** * ** ** * * *

```

FIGURA 6B-4

ES 2 745 470 T3

```

AAV2capNuc 1372 TCAA--GGCTTCAGTTTTCTCAGGCCGGAGCG-AGTGACATTCGGGACCAGTCTAGGAAC 1428
AAV4capNuc1 1354 ACTGCCACCACCACTTTACCAAGCTGCGGCCTACCAACTTTTCCAACTTTAAAAAGAAC 1413
      *   * ** *** ** * * * * * ** * * * * *

```

```

AAV2capNuc 1429 TGGCTTCCTGGACCCTGTTACGCCAGCAGCGAGTATCAAAGACATCTGCGGATAACAAC 1488
AAV4capNuc1 1414 TGGCTGCCCGGCCTTCAATCAAGCAGCAGGGCTTCTCAAAGACTGCCAATCAAACACTAC 1473
      ***** ** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

AAV2capNuc 1489 AACAG---TGAATACTCGTGGACTGGAGCTACCAAGTACCA-----CCTCAAT 1533
AAV4capNuc1 1474 AAGATCCCTGCCACCGGGTCCAGACAGTCTCATCAATACGAGACGCACAGCACTCTGGAC 1533
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

AAV2capNuc 1534 GGCAGAGACTCTCTGGTGAATCCGGGCCGGCCATGGCAAGCCACAAGGACGATGAAGAA 1593
AAV4capNuc1 1534 GGAAGATGGAGTGCCCTGACCCCGGACCTCCAATGGCCACGGCTGGACCTGCGGACAGC 1593
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

AAV2capNuc 1594 AAGTTTTTCTCAGAGCGGGTTCATCTTTGGGAAGCAAGGCTCAGAGAAAACAAT 1653
AAV4capNuc1 1594 AAGTTCAG---CAACAGCCAGCTCATCTTTGCGGGCCTAACAGAACGGCAACACGGCC 1650
      ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

AAV2capNuc 1654 GTGGACATTGAAAAGGTCATGATTACAGACGAAGAGGAAATCAGGACAACCAATCCCGTG 1713
AAV4capNuc1 1651 ACCGTACCCGGGACTCTGATCTTACCTCTGAGGAGGAGCTGGCAGCCACCAACGCCACC 1710
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

AAV2capNuc 1714 GCTACGGAGCAGTATGGTTCTGTATCTACCAACCTCCAGAGAGGCAACAGACAAGCAGCT 1773
AAV4capNuc1 1711 GATACGGACATGTGGGGCAACCTACCTGGCGGTGACCAGAGCAACAGCAACCTGCCGACC 1770
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

FIGURA 6B-5

ES 2 745 470 T3

```

AAV2capNuc 1774 ACCGCAGATGTCAACACACAAGGCGTTCTTCCAGGCATGGTCTGGCAGGACAGAGATGTG 1833
AAV4capNuc1 1771 GTGGACAGACTGACAGCCTTGGGAGCCGTGCCTGGAATGGTCTGGCAAACAGAGACATT 1830
      *      * * *      * * *      * * *      * * *      * * *      * * *      * * *      *
AAV2capNuc 1834 TACCTTCAGGGGCCATCTGGGCAAGATTCCACACACGGACGGACATTTTCACCCCTCT 1893
AAV4capNuc1 1831 TACTACCAGGGTCCCATTGGGCAAGATTCCTCATACCGATGGACACTTTACCCCTCA 1890
      ***     ***** ***** ***** ***** ***** ** ** ** ***** *****
AAV2capNuc 1894 CCCCTCATGGGTGGATTCCGACTTAAACACCCTCCTCCACAGATTCTCATCAAGAACACC 1953
AAV4capNuc1 1891 CCGCTGATTGGTGGGTTTGGGCTGAAACACCCGCCTCCTCAAATTTTATCAAGAACACC 1950
      ** ** ** ***** ** ** ** ***** ***** ** ** * *****
AAV2capNuc 1954 CCGGTACCTGCGAATCCTTCGACCACCTTCAGTGCAGGCAAGTTTGTTCCTTCATCACA 2013
AAV4capNuc1 1951 CCGGTACCTGCGAATCCTGCAACGACCTTCAGCTCTACTCCGGTAACTCCTTCATTACT 2010
      ***** ***** * ** ***** * * * * *****
AAV2capNuc 2014 CAGTACTCCAGGGACAGTGCAGCGTGGAGATCGAGTGGGAGCTGCAGAAGGAAAACAGC 2073
AAV4capNuc1 2011 CAGTACAGCACTGGCCAGGTGTCGGTGCAGATTGACTGGGAGATCCAGAAGGAGCGGTCC 2070
      ***** ** ** ***** ** ** ** ***** * ***** *
AAV2capNuc 2074 AAACGCTGGAATCCCGAAATTCAGTACACTTCCAACATAACAAGTCTGTTAATGTGGAC 2133
AAV4capNuc1 2071 AAACGCTGGAACCCCGAGGTCCAGTTTACCTCCAACACGGACAGCAAACTCTCTGTTG 2130
      ***** ***** * *** ** ***** ** * **
AAV2capNuc 2134 TTTACTGTGGACACTAATGGCGTGTATTCAGAGCCTCGCCCCATTGGCACCAGATACCTG 2193
AAV4capNuc1 2131 TGGGCTCCCGATGCGGCTGGGAAATACACTGAGCCTAGGGCTATCGGTACCCGCTACCTC 2190
      * ** ** * *** ** * ***** * * ** ** * **

```

FIGURA 6B-6

```
AAV2capNuc 2194 ACTCGTAATCTGTAA 2208
AAV4capNuc 2191 ACCCACCACCTGTAA 2205
          ** * * *****
```

FIGURA 6B-7